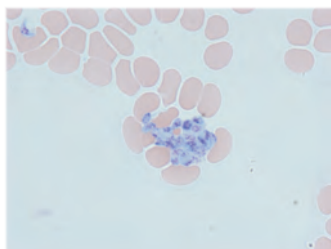
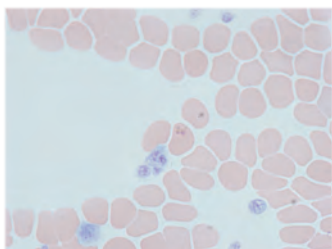


VOLLBLUTAGGREGATION BEIM HUND: VERGLEICH DER METHODE NACH BORN MIT EINER ERRECHNETEN AGGREGATION NACH THROMBOZYTENZÄHLUNG MITTELS KONVENTIONELLER HÄMATOLOGIESYSTEME

CHRISTINE SIMON



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin - Klinik für Kleintiere
Klinische Pathophysiologie und Klinische Laboratoriumsdiagnostik
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. A. Moritz

**Vollblutaggregation beim Hund:
Vergleich der Methode nach Born mit einer errechneten
Aggregation nach Thrombozytenzählung mittels
konventioneller Hämatologiesysteme**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Christine Simon
Tierärztin aus Marktheidenfeld

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. A. Moritz
Dr. C. Rummel

Tag der Disputation: 24.11.2009

Meiner Mutter

In Rahmen der Doktorarbeit verwendete Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ADVIA 120	Hämatologiesystem ADVIA 120
ALT	Alaninaminotransferase
AP	alkalische Phosphatase
APACT 4	Aggregometer APACT 4
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
ASS	Acetylsalicylsäure
AST	Aspartataminotransferase
AT III	Antithrombin III
ATP	Adenosiontriphosphat
C	Citrat
C8	Citratprobe zum Zeitpunkt 8 Minuten
Ca	Kalzium
Cl ⁻	Chlorid
cAMP	zyklisches 3',5' - Adenosinmonophosphat
COX	Cyclooxygenase
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2
fl	Femtoliter
g	relative Zentrifugalbeschleunigung
G	Gauche
GMP	Guanosinmonophosphat
Gp (GP)	Glykoprotein
γ-GT	Gamma – Glutamyltransferase
GLDH	Glutamatdehydrogenase
IE	Internationale Einheit
IGPD	Inherited Giant Platelet Disorder
K	Kontrolle
K ⁺	Kalium
K8	Kontrolle zum Zeitpunkt 8 Minuten
K3EDTA	Tri-Kalium-Ethylendiamintetraessigsäure
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht

LH	Lithiumheparin
LUC	Große peroxidasenegative Zellen (large unstained cells)
LTB4	Leukotrien B4
LTC4	Leukotrien C4
LTD4	Leukotrien D4
LTE4	Leukotrien E4
µl	Mikroliter
MPC	mittlere Konzentration der internen Thrombozytenbestandteile oder Thrombozytendichte (mean platelet component concentration)
MPV	Mittleres Thrombozytenvolumen (mean platelet volume)
mRNA	messenger RNA (Ribonucleinsäure)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MW	Mittelwertsunterschied
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NC	Natriumcitrat
Nm	Nanometer
NSAID	Nicht steroidales Antiphlogistikum
P	Probe
P8	Probe zum Zeitpunkt 8 Minuten
PAF	plättchenaktivierender Faktor
Ph	Phosphat
PCDW	Verteilungsbreite der mean platelet component concentration
PCT	Thrombokrit (plateletcrit)
PGD2	Prostaglandin D2
PDE2	Prostaglandin E2
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PFA - 100	Plättchenfunktionsanalysegerät PFA - 100
PGF2	Prostaglandin F2
PGI2	Prostaglandin I2
PLT	Thrombozyten (platelets)
PDW	Thrombozytenverteilungsbreite (platelet distributions width)
PPP	plättchenarmes Plasma (platelet poor plasma)

PT	Prothrombinzeit
PRP	plättchenreiches Plasma (platelet rich plasma)
RTG	Resonanzthrombelastogramm
SD	Standardabweichung
TEG	Thrombelastogramm
TGF β	Transforming Growth Factor beta
TXA ₂	Thromboxan A ₂
TXB	Thromboxan B
TZ	Thrombinzeit
VetABC	Hämatologiesystem VetABC Fa. Scill
vs	versus

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Aufgabenstellung	1
2.	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1.	Thrombozytopoese	2
2.2.	Morphologie und Aufbau der Thrombozyten	3
2.3.	Funktion der Thrombozyten	5
2.4.	Thrombozytopenien und Thrombozytopathien	11
2.4.1.	<u>Thrombozytopenien</u>	11
2.4.2.	<u>Thrombozytopathien</u>	11
2.4.2.1.	Hereditäre Erkrankungen	11
	Von Willebrandt-Faktor-Mangel	11
	„Inherited Giant Platelet Disorder“ (IGPD) des Cavalier King Charles Spaniel	12
	Glanzmann Thrombastenie	13
	Basset Hound Thrombopathie	13
	“Storage pool diseases” – Thrombozytenspeicherkrankheit	14
2.4.2.2.	Erworbene Thrombopathien	14
2.4.2.2.1.	Erworbene Störungen mit reduzierter Thrombozytenfunktion	15
	Urämie	15
	Leberinsuffizienz	15
	Hyperproteinämie	16
	Neoplasien	16
	Medikamente	17
2.4.2.2.2.	Erworbene Störungen mit gesteigerter Thrombozytenfunktion	18
	Diabetes mellitus	18
	Nephrotisches Syndrom	18
	Hormone	19
	Neoplasien	19
	Dirofilariose	19
	Asthma	19

2.4.2.2.3.	Einfluss einer Anämie auf die Thrombozytenfunktion	20
2.4.2.2.4.	Einfluss von Heparin auf die Thrombozytenfunktion	20
2.4.2.2.5.	Einfluss von Acetylsalicylsäure auf die Thrombozytenfunktion	22
2.5.	Thrombozytenfunktionsdiagnostik	24
2.5.1.	<u>Schleimhautblutungszeit</u>	24
2.5.2.	<u>Thrombozytenaggregationsmessung nach Breddin</u>	25
2.5.3.	<u>Thrombelastographie / Resonanzthrombelastographie</u>	25
2.5.4.	<u>Thrombozytenaggregationsmessung nach Born</u>	27
2.5.5.	<u>Impedanzmethode</u>	30
2.5.6.	<u>Das Plättchenfunktionsanalysegerät PFA – 100</u>	31
2.5.7.	<u>Aggregationsberechnung nach der Bestimmung der Thrombozytenzahl im Vollblut</u>	32
2.5.7.1.	Bestimmung der Thrombozytenzahl durch die Hämatologiegeräte ADVIA 120™ und VetABC™	33
2.6.	Thrombozytenparameter des ADVIA 120™	36
2.7.	Aggregationsinduktoren	37
3.	MATERIAL UND METHODEN	39
3.1.	Studienaufbau	39
3.2.	Geräte, Reagenzien, Materialien und Medikamente	40
3.3.	Probanden	41
3.4.	Durchführung der Untersuchungen	42
3.4.1.	<u>Bestimmung der Blutungszeit</u>	42
3.4.2.	<u>Blutprobenentnahme und Aufbewahrung</u>	42
3.4.3.	<u>Hämatologische und klinisch chemische Blutuntersuchungen</u>	43
3.4.3.1.	Untersuchung der Thrombozytenaggregation an gesunden Probanden (Gruppe 1)	44
3.4.3.1.1.	Bestimmung der Thrombozytenfunktion mittels Aggregometer	44
3.4.3.1.2.	Bestimmung der Thrombozytenaggregation nach Ermittlung der Thrombozytenzahl durch beide Hämatologiesysteme	44

3.4.3.1.3.	Auswertung der Thrombozytenparameter des ADVIA 120™	45
3.4.3.2.	<i>In vitro</i> – Veränderungen	47
3.4.3.2.1.	<i>In vitro</i> – Veränderung Anämie (Gruppe 2)	47
3.4.3.2.2.	<i>In vitro</i> – Veränderung Heparin (Gruppe 3)	47
3.4.3.2.3.	<i>In vitro</i> – Veränderung Acetylsalicylsäure (Gruppe 4)	47
3.4.4.	<u>Statistische Untersuchungen</u>	48
4.	ERGEBNISSE	50
4.1.	Ergebnisse bei unveränderten Blutproben (Gruppe 1)	51
4.1.1.	<u>Probanden</u>	51
4.1.2.	<u>Schleimhautblutungszeit</u>	51
4.1.3.	<u>Vergleich der prozentualen Aggregation bei unterschiedlichen Kollagenkonzentrationen</u>	52
4.1.4.	<u>Prozentuale Aggregation der Geräte im Vergleich</u>	54
4.1.4.1.	Vergleich der prozentualen Aggregation nach Messung mit dem APACT 4™ Aggregometer und dem ADVIA 120™	56
4.1.4.2.	Vergleich der prozentualen Aggregation nach Messung mit dem APACT 4™ Aggregometer und dem VetABC™	58
4.1.4.3.	Vergleich der prozentualen Aggregation nach Messung mit dem ADVIA 120™ und dem VetABC™	60
4.1.5.	<u>Thrombozytenparameter</u>	62
4.1.5.1.	Mittleres Thrombozytenvolumen – MPV	62
4.1.5.2.	Mittlere Konzentration innerer Thrombozytenbestandteile – MPC	64
4.1.5.3.	Verteilungsbreite der mittleren Konzentration innerer Thrombozytenbestandteile – PCDW	66
4.1.5.4.	Große Thrombozyten – large PLT	68
4.1.5.5.	Thrombozytenverteilungsbreite – PDW	72
4.1.5.6.	Thrombozytenaggregate – Clumps	74
4.1.5.7.	Große peroxidasenegative Zellen – LUC	76
4.1.5.8.	Tabellarische Übersicht über die Auswirkungen der Aggregation auf die Thrombozytenparameter des ADVIA 120™	79

4.2.	Ergebnisse der simulierten Anämie im Vergleich mit einer unbearbeiteten Kontrolle (Gruppe 2)	80
4.2.1.	<u>Vergleich der Thrombozytenaggregation zwischen Kontrolle und anämischer Probe nach Messung am ADVIA 120™</u>	80
4.2.2.	<u>Vergleich der Thrombozytenaggregation zwischen Kontrolle und anämischer Probe nach Messung am VetABC™</u>	82
4.2.3.	<u>Vergleich der Aggregation des ADVIA 120™ und des VetABC™ zwischen Kontrolle und Anämie</u>	84
4.3.	Ergebnisse der Proben unter Einfluss von Heparin (Gruppe 3)	85
4.3.1.	<u>Vergleich der verschiedenen Heparinkonzentrationen zu einer Kontrolle</u>	85
4.3.1.1.	Vergleich des Einflussfaktors Heparinkonzentration zur Kontrolle nach Messung am APACK 4™ Aggregometer	86
4.3.1.2.	Vergleich des Einflussfaktors Heparinkonzentration auf die am ADVIA 120™ bestimmte Aggregation	88
4.3.1.3.	Vergleich des Einflussfaktors Heparinkonzentration auf die am VetABC™ bestimmte Aggregation	90
4.3.2.	<u>Methodenvergleich der einzelnen Geräte unter Einfluss von Heparin im Vergleich zur Kontrolle</u>	91
4.3.2.1.	Vergleich der Differenzen zwischen den Resultaten des APACK 4™ Aggregometers und des ADVIA 120™ bei verschiedenen Heparinkonzentrationen	92
4.3.2.2.	Vergleich der Differenzen zwischen den Resultaten des APACK 4™ Aggregometers und des VetABC™ bei verschiedenen Heparinkonzentrationen	93
4.3.2.3.	Vergleich der Differenzen zwischen den Resultaten des ADVIA 120™ und des VetABC™ bei verschiedenen Heparinkonzentrationen	94
4.3.3.	<u>Untersuchung der Einflussfaktoren Heparinkonzentration und Einwirkzeit auf die Thrombozytenaggregation</u>	95

4.3.3.1.	Vergleich der Einflussfaktoren Konzentration und Zeit auf die Thrombozytenaggregation nach Messung am APACT 4™ Aggregometer	96
4.3.3.2.	Vergleich der Einflussfaktoren Konzentration und Zeit auf die Thrombozytenaggregation nach Messung am ADVIA 120™	98
4.3.3.3.	Vergleich der Einflussfaktoren Konzentration und Zeit auf die Thrombozytenaggregation nach Messung am VetABC™	100
4.4.	Ergebnisse der Proben unter Einfluss von Acetylsalicylsäure (Gruppe 4)	101
4.4.1.	<u>Einfluss unterschiedlicher Acetylsalicylsäurekonzentrationen im Vergleich zur Kontrolle</u>	101
4.4.1.1.	Einfluss der Acetylsalicylsäurekonzentration (ASS) auf die mittels APACT 4™ Aggregometer gemessene Aggregation	102
4.4.1.2.	Einfluss der Acetylsalicylsäurekonzentration (ASS) auf die mittels ADVIA 120™ gemessene Aggregation	104
4.4.1.3.	Einfluss der Acetylsalicylsäurekonzentration (ASS) auf die Mittels VetABC™ gemessene Aggregation	106
4.4.2.	<u>Methodenvergleich der einzelnen Geräte unter Einfluss von Acetylsalicylsäure im Vergleich zur unveränderten Probe</u>	108
4.4.2.1.	Einfluss der ASS – Konzentration auf die Messwertsunterschiede zwischen dem APACT 4™ Aggregometer und dem ADVIA 120™	109
4.4.2.2.	Einfluss der ASS – Konzentration auf die Messwertsunterschiede zwischen dem APACT 4™ Aggregometer und dem VetABC™	110
4.4.2.3.	Einfluss der ASS – Konzentration auf die Messwertsunterschiede zwischen dem ADVIA 120™ und dem VetABC™	111
4.4.3.	<u>Untersuchung der Einflussfaktoren Acetylsalicylsäurekonzentration und Einwirkzeit auf die Thrombozytenaggregation</u>	112

4.4.3.1.	Vergleich der Einflussfaktoren Konzentration und Zeit auf die Thrombozytenaggregation nach Messung am APACT 4™ Aggregometer	112
4.4.3.2.	Vergleich der Einflussfaktoren Konzentration und Zeit auf die Thrombozytenaggregation nach Messung am ADVIA 120™	114
4.4.3.3.	Vergleich der Einflussfaktoren Konzentration und Zeit auf die Thrombozytenaggregation nach Messung am VetABC™	116
5.	DISKUSSION	118
5.1.	Prozentuale Aggregation bei unterschiedlichen Kollagenkonzentrationen	118
5.2.	Prozentuale Aggregation bei gesunden Probanden (Gruppe 1)	119
5.2.1.	<u>Vergleich der Geräte</u>	121
5.3.	Vergleich der Thrombozytenparameter vor und nach Aggregation am ADVIA 120™	122
5.3.1.	<u>Mittleres Thrombozytenvolumen – MPV</u>	123
5.3.2.	<u>Mittlere Konzentration innerer Thrombozytenbestandteile – MPC</u>	123
5.3.3.	<u>Verteilungsbreite der mittleren inneren Thrombozytenbestandteile – PCDW</u>	124
5.3.4.	<u>Große Thrombozyten – large PLT</u>	124
5.3.5.	<u>Thrombozytenverteilungsbreite – PDW</u>	125
5.3.6.	<u>Große peroxidasenegative Zellen – LUC</u>	125
5.3.7.	<u>Thrombozytenaggregate – Clumps</u>	126
5.4.	Einfluss der Anämie auf die Thrombozytenaggregation (Gruppe 2)	126
5.5.	Einfluss von Heparin auf die Thrombozytenaggregation (Gruppe 3)	127

5.6.	Einfluss von Acetylsalicylsäure auf die Thrombozytenaggregation (Gruppe 4)	128
6.	ZUSAMMENFASSUNG	131
7.	SUMMARY	135
8.	LITERATURÜBERSICHT	138
9.	DANKSAGUNG	147

1. EINLEITUNG

1.1. Aufgabenstellung

Die Thrombozytenfunktionsmessung stellt die einzige Möglichkeit zur Messung der physiologischen Funktion von Thrombozyten, sowie der Erkennung angeborener und erworbener Störungen der Thrombozytenfunktion dar. Weiterhin ist sie zur Überwachung einer medikamentellen Einstellung von Patienten mit gerinnungshemmenden Medikamenten unentbehrlich und wird daher in der Humanmedizin häufig durchgeführt. In der veterinärmedizinischen Praxis finden Thrombozytenfunktionstests dagegen selten Verwendung. Dies liegt zum einen an einem hohen technischen Geräteaufwand und zum anderen an der zeitaufwendigen Aufbereitung der Proben zur Untersuchung. Außerdem ist das Versenden von Proben aufgrund der notwendigen schnellen Verarbeitung nach der Blutentnahme nicht möglich.

Aus diesem Grund soll in dieser Studie ein Vergleich zwischen der Standardmethode zur Messung der Thrombozytenaggregation nach BORN und der Aggregationsmessung mittels des Multi-Spezies-Hämatologiesystems ADVIA 120™ und eines in der Praxis weit verbreitetem Hämatologiegerätes (VetABC™) gezogen werden, die eine Messung der Thrombozytenfunktion in der veterinärmedizinischen Praxis kostengünstig und unkompliziert ermöglichen würde.

Das Ziel dieser Arbeit ist daher der Vergleich der beiden Methoden für die Thrombozytenaggregation beim gesunden Hund. Des Weiteren sollen potentielle Einflussfaktoren auf die Thrombozytenaggregation *in vitro* überprüft werden.

2. LITERATURÜBERSICHT

In den folgenden Kapiteln soll eine Übersicht über die Bildung, den Aufbau und die Funktion der Thrombozyten gezeigt werden. Es werden die physiologische Funktion und Erkrankungen mit gesteigerter und verminderter Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten aufgeführt, die verschiedenen Möglichkeiten zur Messung der Thrombozytenfunktion und die zur Funktionsüberprüfung relevanten Aggregationsinduktoren vorgestellt.

2.1. Thrombozytopoese

Die Vorläuferzelle des Thrombozyten im Knochenmark ist der Megakaryozyt. Er entwickelt sich aus einer pluripotenten Stammzelle. Im Rahmen seiner Reifung im Knochenmark schnüren sich aus dem Zytoplasma eines Megakaryozyten zirka 1000 bis 1500 Thrombozyten ab. Die Thrombozytenbildung wird hormonell durch Thrombopoetin reguliert. Thrombopoetin wird in der Leber, den Nieren und im Knochenmark gebildet (1). In human- und veterinärmedizinischen Untersuchungen konnten mehrere Mechanismen der Regulation von Thrombopoetin gefunden werden (1). Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen den Thrombopoietinleveln des Knochenmarks und des Blutes und der im peripheren Blut vorhandenen Thrombozytenzahl, so dass bei Thrombopenien eine deutliche Erhöhung der Thrombopoietinlevel gemessen werden konnten (2). Thrombozyten besitzen einen Thrombopoietinrezeptor, der Thrombopoietin aus dem Blut binden kann. Bei einer bestehenden Thrombozytopenie bleibt eine größere Menge des Hormons in Lösung, so dass die gesteigerte Produktion von Blutplättchen erreicht wird (3). In Studien am Menschen und Mäusen konnte bei bestehenden Thrombopenien eine deutlich Erhöhung von Thrombopoietin mRNA in den Zellen des Knochenmarksstromas nachgewiesen werden. Die humoralen und zellulären Mediatoren dieses Effektes werden noch genauer untersucht. In einer Untersuchung konnte nachgewiesen werden, dass eine Erhöhung von PDGF (platelet α -granule proteins) und FGF-2 zu einer gesteigerten Thrombopoietinproduktion im Knochenmark führen, während der Einfluss von Plättchenfaktor 4, Thrombospondin und TGF- β die Produktion im

Knochenmarksstroma hemmen (4). Auf die Produktion von Thrombopoietin in der Leber haben diese Faktoren allerdings keinen Einfluss (5).

Eine gesteigerte Thrombopoese kann ebenso bei entzündlichen Geschehen gefunden werden. Durch das Zytokin Interleukin 6 kommt es zu einer gesteigerten Produktion von Thrombopoietin in der Leber, welches wiederum zu einer Thrombozytose führen kann (6).

2.2. Morphologie und Aufbau der Thrombozyten

Da es sich bei Thrombozyten von Säugetieren um Zytoplasmafragmente der Megakaryozyten handelt, haben sie keinen Zellkern und werden daher auch als Blutplättchen bezeichnet. Kernhaltige Thrombozyten finden sich bei Reptilien, Fischen und Vögeln (7). Im nicht aktivierten Zustand liegen die Thrombozyten von Säugetieren in diskoidaler Form vor und haben eine Länge von etwa 5-7 μm und einen Durchmesser von etwa 3 μm (8).

Trotz ihrer geringen Größe zeigen Thrombozyten eine Vielzahl an Zellorganellen und Inhaltsstoffen zur Aktivierung, Adhäsion und Aggregation. Der Thrombozyt ist von einer Glykokalyx (Dicke 15-20nm) umgeben (9). In dieser Glykokalyx befinden sich verschiedene Glykoproteine, die Rezeptorfunktionen für Interaktionen des Thrombozyten enthalten (9).

Die wichtigsten Rezeptoren sind der Thrombinrezeptor (GP V), der Kollagenrezeptor (GP Ia , GP IIa) für die Anheftung der Thrombozyten an die Gefäßwand, der Fibrinogenrezeptor (GP IIb / IIIa) zur Vernetzung der Thrombozyten untereinander (10) und der von Willebrand - Rezeptor (GP Iba, GP Ib β , GP IV), der ebenfalls der Anheftung des Thrombozyten an die Gefäßwand dient. Weiterhin sind Laminin - (GP IIa, GP Ic), Thrombospondin - (GP IIb) und Fibronektinrezeptoren (GP IIa, Ic) an der Thrombozytenoberfläche zu finden (11).

Unter der Glykokalyx liegt die Plasmamembran, die zahlreiche Invaginationen enthält, die untereinander ein Kanalsystem bilden (open canicular system). Dieses System ist bei den verschiedenen Tierarten unterschiedlich stark ausgebildet oder wie beim Rind nicht vorhanden (12). Beim Hund vergrößert dieses Kanalsystem einerseits die Oberfläche des Thrombozyten, andererseits können Stoffe aus dem Blutplasma aufgenommen oder granulagebundene Inhaltsstoffe in das Blut

abgegeben werden (8). Für die Aufrechterhaltung der discoidalen Form finden sich Mikrotubuli und Filamente im Zytosol. Dieses enthält weiterhin Fasersysteme zur Pseudopodienausbildung, Retention und Sekretion (13).

Im Zytosol befinden sich auch verschiedene Granula, von denen den größten Anteil die α -Granula darstellen. Sie enthalten Plasmaproteine, wie zum Beispiel Fibrinogen, Fibronectin, Albumin, Plasminogen oder den von Willebrand-Faktor, andererseits finden sich auch plättchenspezifische Proteine wie der Plättchenfaktor 4, Thromboglobulin oder der platelet derived growth factor (PDGF), der das Wachstum der Gefäßendothelzellen stimuliert (14). Als γ -Granula werden die Tubuli bezeichnet. In den δ -Granula befinden sich eisenspeichernde Zytosomen (Siderosomen) und die ϵ -Granula bestehen aus Glykogen zur Speicherung von Energie. In den dichten Granula (dense granula) befinden sich ADP, ATP, Serotonin, Kalzium und Pyrophosphat. Weiterhin enthalten die dichten Granula 65% der Thrombozyten-Nukleotide, die bei Stimulation mit Thrombin freigesetzt werden (15). Die ebenfalls im Zytoplasma vorhandenen Lysosomen enthalten saure Hydrolasen, Arylsulfatasen und saure Phosphatasen, die ebenfalls durch Stimulation freigesetzt werden können und der Aktivierung weiterer Thrombozyten dienen. Die energetische Versorgung des Plättchens erfolgt über Glykolyse und den Pentosephosphatweg (16).

2.3. Funktion der Thrombozyten

Thrombozyten haben eine Funktion in der primären Hämostase, sowie in der Vermittlung von Entzündungsreaktionen im Körper.

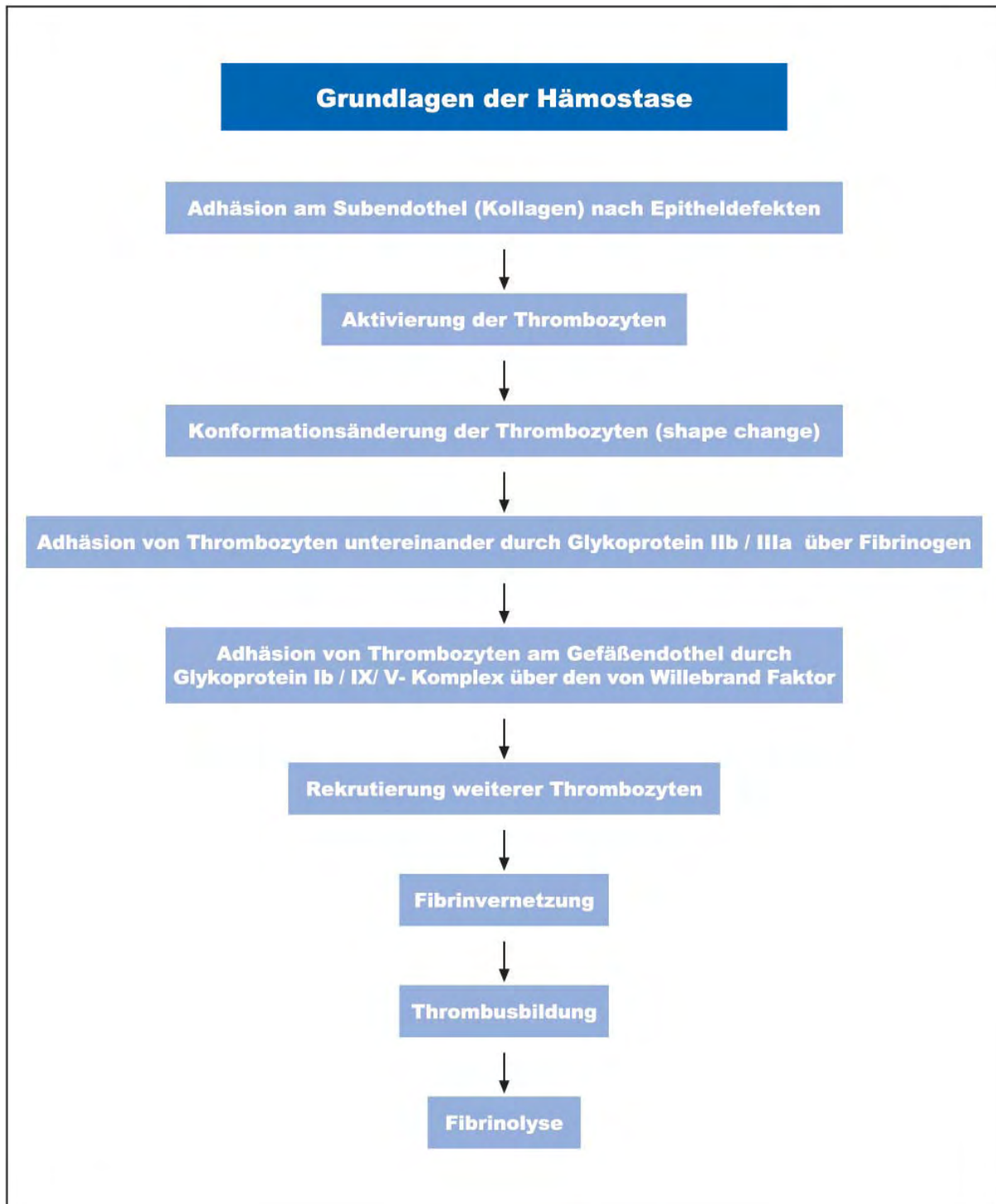


Abbildung 1: Schematisch Darstellung der Hämostase in ihrem zeitlichen Ablauf

Im Blut zirkulierende Thrombozyten reagieren normalerweise weder mit der Gefäßwand noch mit anderen Thrombozyten, aber sie reagieren umgehend bei Verletzungen des Endothels (17)..

Nach der Anheftung einzelner Thrombozyten wird eine Kaskade von Reaktionen in Gang gesetzt, die zur Aktivierung und Rekrutierung weiterer Thrombozyten und Aggregation am Defekt und an den bereits vorhandenen Thrombozyten führt. Der Hauptgrund für die Aktivierung der ruhenden Thrombozyten ist die Freilegung von Kollagenfasern aus dem verletzten Endothel. Zuerst kommt es durch die Ausschüttung von endogenen Agonisten aus den Granula der Thrombozyten (u.a. ADP, Serotonin, Thromboxanen) zu einer Verstärkung des Aggregationsprozesses. Nach der Aktivierung führt die Ausschüttung der Adhäsionsproteine (Fibrinogen, Fibronectin, von Willebrand Faktor oder Thrombospondin) zu einer irreversiblen Aggregation (16). Das Glykoprotein IIb-IIIa vernetzt über Fibrinogen die Thrombozyten untereinander während der Glykoproteinkomplex Ib / IX / V über den von Willebrand-Faktor die Adhäsion der Thrombozyten an die Gefäßwand vermittelt (Abbildung 2) (18). Diese Vernetzung verhindert das Abschwemmen der noch frei zirkulierenden Thrombozyten über den Blutstrom. Die Rekrutierung wird weiterhin beeinflusst durch die Freisetzung von Aggregationsinduktoren wie Adenosindiphosphat (ADP), Serotonin und Epinephrin, die aus den Granula der Thrombozyten freigesetzt werden (19).

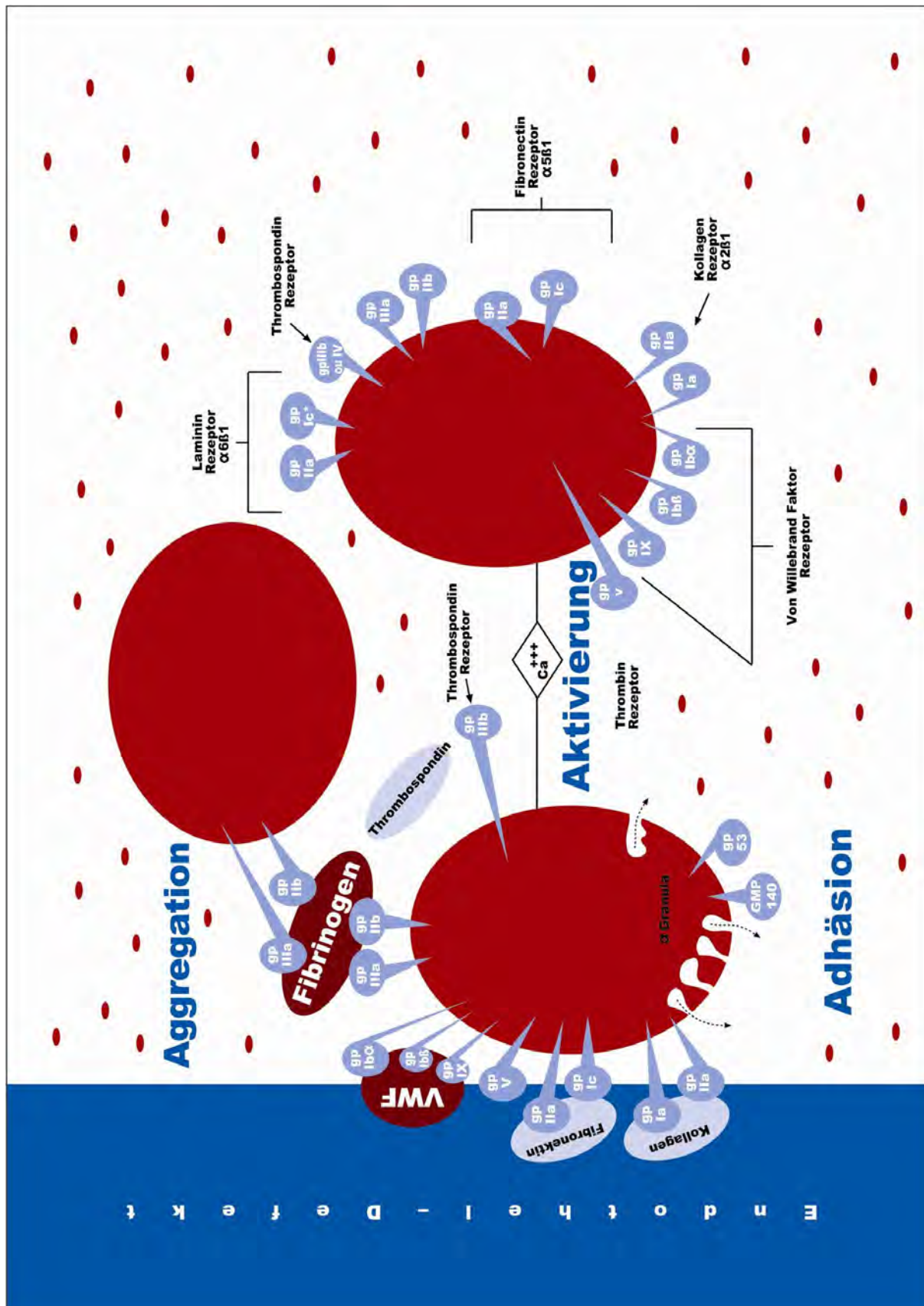


Abbildung 2: Darstellung der Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten
 Abkürzungen: gp = Glykoprotein, Ca = Kalzium, GMP = Guanosinmonophosphat

Bei der Produktion von Hormonen zeichnet sich der Thrombozyt vor allem durch die Freisetzung von Thromboxanen und Prostaglandinen aus, deren Synthese von Arachidonsäure ausgeht. Die Aktivierung der Arachidonsäure erfolgt mittels des Enzyms Phospholipase A2 aus den Phosphatidylcholin- und Phosphatidylinositol-Komponenten der Membranphospholipide (20). Die Produktion der Entzündungsmediatoren ist abhängig von dem Enzym Cyclooxygenase (COX), das in zwei Isoenzymen COX-1 und COX-2 vorliegt. Die Thrombozyten besitzen COX-1 und 2. Jedoch wird die biologische Relevanz von COX-2 in Thrombozyten kontrovers diskutiert (21). Über die Bildung der instabilen Zwischenprodukte, Prostaglandin (PG) G2 und Prostaglandin H2, kommt es zur Synthese von Thromboxan A2 über die Thromboxansynthetase, zur Bildung von Prostacyclin über die Prostacyclinsynthetase oder zur Bildung von PGD2, PGE2 und PGF2 durch verschiedene Isomerasen (Abbildung 3). Einige dieser Enzyme wie z.B. die in den Thrombozyten lokalisierte Thromboxansynthetase sind gewebespezifisch, so dass Thromboxan A2 das Hauptsyntheseprodukt der Blutplättchen darstellt. Thromboxan A2 ist ein potenter Vasokonstriktor und Induktor der Thrombozytenaggregation, wobei es jedoch mit seiner Halbwertszeit von 30 Sekunden sehr instabil ist und rasch in seine inaktive Isoform, das Thromboxan B2 konvertiert wird (22).

In den Thrombozyten liegen somit das weniger stabile aktive Thromboxan A2 und das stabilere inaktive Thromboxan B2 vor. Welche Thromboxan-Isoform gebildet wird, hängt auch von denen das Plättchen aktivierenden Stimulatoren ab. So produzieren Thrombozyten, deren Stimulation durch Thrombin oder Kollagen erfolgt mehr inaktives Thromboxan B2, als solche, die durch ADP oder PAF stimuliert werden (23). Die Menge an metabolisiertem Thromboxan B2 ist speziesabhängig. Beim Hund wurde ein Unterschied bei verschiedenen Rassen festgestellt. Ebenso zeigen sich Unterschiede bei der Aktivierung der Thrombozyten durch Thromboxane und Arachidonsäure bei unterschiedlichen Hunderassen. Dies ist insofern interessant, als dass Hunderassen auf den Einfluss nichtsteroidaler Antiphlogistika, die auf Hemmung des Arachidonsäuremetabolismus basieren mit einer sehr variablen Hemmung der Thrombozytenaggregation reagieren können (23).

Der plättchenaktivierende Faktor (PAF) spielt eine große Rolle in der Entzündungsantwort. Die Synthese erfolgt aus Phosphatidylcholin mit Hilfe der Phospholipase A2. Der Grad der Aktivierung der Blutplättchen durch PAF ist speziesabhängig sehr unterschiedlich stark ausgeprägt. So zeigen zum Beispiel die

Thrombozyten von Mäusen, Hamstern und Ratten keine Reaktion auf die Aktivierung mit PAF (23).

Um eine ungeregt ablaufende Aktivierung oder Aggregation der Thrombozyten zu verhindern, finden sich Mechanismen, welche die Thrombozytenaktivierung unterdrücken. Unter anderem kommt es zur Synthese von Prostaglandin I₂ (PGI₂) in den Endothelzellen (12). Die Produktion von PGI₂ wird durch das Auftreten von Aggregationsinduktoren, Entzündungsmediatoren (Histamin, Bradykinin), Arachidonsäure und andere Mediatoren, wie zum Beispiel ADP beeinflusst. Es ist ein Thromboxanantagonist und Aktivator der Adenylatzyklase in Thrombozyten und hemmt somit die Aggregation (23).

Durch eine Interaktion von PGI₂ mit spezifischen Membranproteinen am Thrombozyten kommt es zum Anstieg des cAMP und somit zu einer Unterdrückung der Thrombozyten-Aktivierung.

Die im Gefäßendothel vorhandene Prostazyklinsynthetase, ein Enzym, das die Bildung von PGI₂ katalysiert, dient ebenso der Regulation der Aggregation. Prostazyklin ist ein Vasodilatator und potenter Antagonist der Thrombozytenaggregation und somit ein Gegenspieler von Thromboxan A₂. Aus diesem Grund wurde eine Thromboxan A₂- und Prostazyklin-Imbalanz als ein frühes Stadium der Entstehung von Thromben im Koronargefäßen und zerebralen Gefäßen angenommen (22).

Weitere Substanzen, die einer systemischen Ausbreitung des Gerinnungsprozess entgegenwirken sind Antithrombin III und Protein C (24). Antithrombin III wirkt durch Inaktivierung der Faktoren XIIa, XIa, Xa, IXa und Thrombin. Das in der Leber synthetisierte Protein C bewirkt zusammen mit Protein S als Cofaktor eine Inaktivierung von Faktor Va und IVa. Der aus den Endothelzellen freigesetzte Plasminogenaktivator ist eine Serinprotease und fördert durch Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin die Fibrinolyse (24) (25).

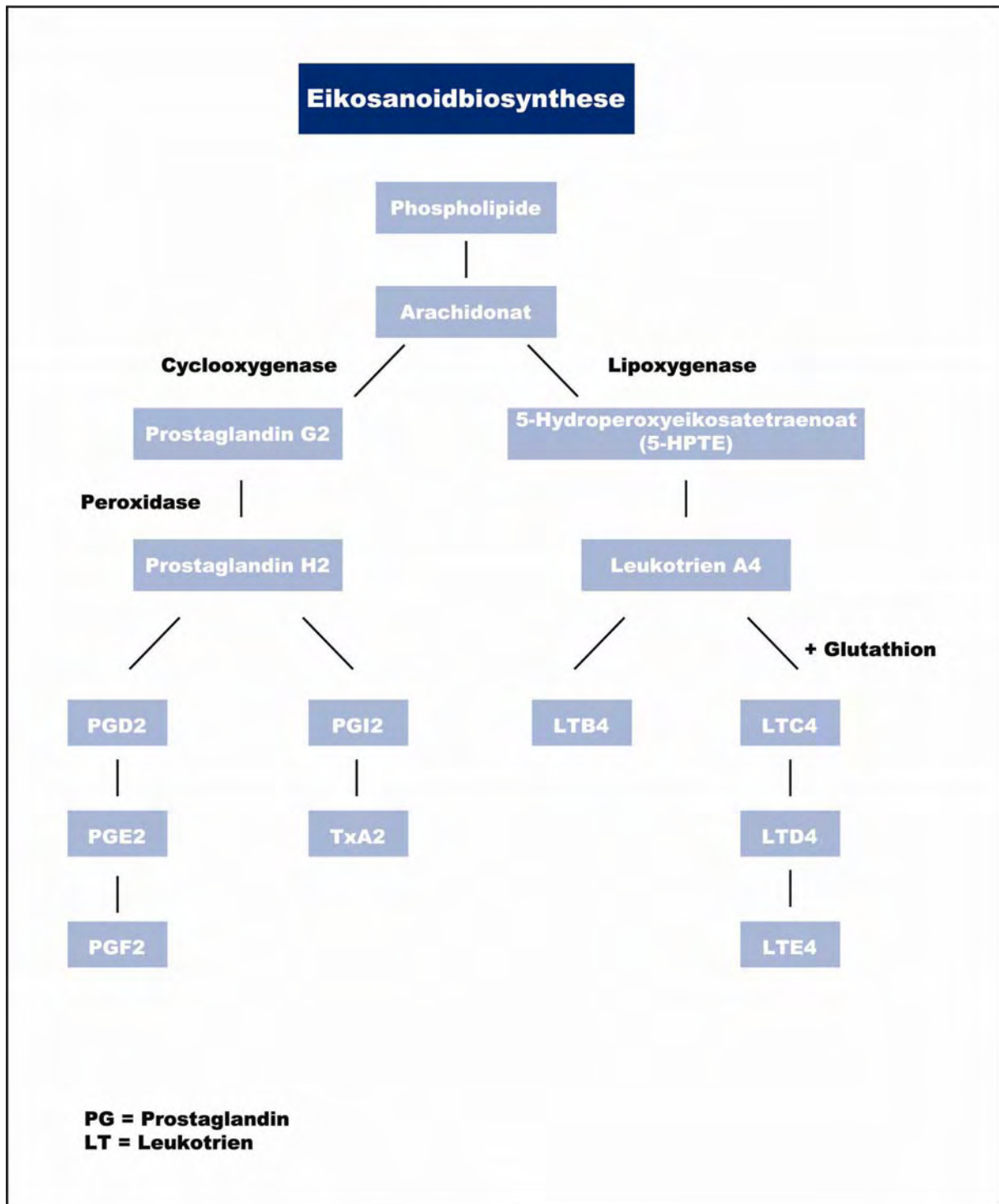


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Eikosanoidbiosynthese

Abkürzungen: PG = Prostaglandin, LT = Leukotrien, TxA2 = Thromboxan A2

2.4. Thrombozytopenien und Thrombozytopathien

In diesem Kapitel sollen angeborene Störungen der Thrombozytenfunktion und erworbene Krankheiten mit gesteigerter und verminderter Aggregation aufgeführt werden.

2.4.1. Thrombozytopenien

Thrombozytopenien treten in der Praxis häufig auf. Die Diagnostik stellt jedoch im Gegensatz zur Thrombozytenfunktionsmessung kein Problem dar, da Thrombopenien schnell und einfach über eine hämatologische Untersuchung mit geeigneten Hämatologiesystemen bzw. der Untersuchung eines Blutausstriches diagnostiziert werden können.

2.4.2. Thrombozytopathien

2.4.2.1. Hereditäre Erkrankungen

Es sind nur wenige hereditäre Störungen der Thrombozytenfunktion beim Hund bekannt. Diese sollen im Folgenden dargestellt werden.

Von Willebrandt-Faktor Mangel

Der von Willebrandt-Faktor vermittelt die Anheftung der Thrombozyten an die Gefäßwand, wobei die Funktion der Thrombozyten selbst nicht verändert ist. Weiterhin ist er Träger des Faktors VIII.

Daher zählt der von Willebrandt Faktormangel im engeren Sinne zwar nicht zu den Thrombozytopathien, wird in der Literatur aber häufig bei den angeborenen Thrombozytenfunktionsstörungen aufgeführt.

Der von Willebrandt-Faktorenmangel ist die beim Hund am häufigsten auftretende angeborene Erkrankung mit erhöhter Blutungsneigung (26). Anhand der Art des Defektes lassen sich beim Hund – ähnlich wie beim Menschen - drei verschiedene Subtypen feststellen (26).

Beim Typ I handelt es sich um eine erniedrigte Konzentration ($<50\%$) eines normal funktionierenden Faktors, während bei dem beim Hund selten vorkommenden Typ II ein Funktionsdefekt des Faktors infolge struktureller Abnormalitäten bei erniedrigter bis physiologischer Konzentration des von Willebrand-Faktors vorliegt. Beim Typ III lassen sich nahezu keine Konzentrationen des von-Willebrand-Faktors nachweisen ($<0.1\%$). Bei dem von Willebrand-Faktor Mangel handelt sich um eine hereditäre, autosomal rezessive Erkrankung, die bei über 50 Rassen beschrieben wurde. Am häufigsten wird der von Willebrand-Faktor Mangel bei Dobermännern (27), Deutschen Schäferhunden, Pudeln und Golden Retrievern nachgewiesen.

Der Schweregrad der klinischen Symptomatik hängt vom Typ des von Willebrandt Faktor Mangels ab. Hunde mit einem Typ I von Willebrand-Faktor Mangel zeigen - wenn überhaupt - nur milde spontane Blutungen, allerdings fallen sie bei chirurgischen Eingriffen durch verlängerte Gerinnungszeiten auf. Patienten mit einem Typ II oder Typ III von Willebrand-Faktor-Mangel zeigen eine hochgradige Blutungsneigung. Als Screening - Test vor Operationen eignet sich die Schleimhautblutungszeit zur Erkennung (28). Sollte diese verlängert sein, kann die Diagnose über die Bestimmung der Konzentration des Faktors in kommerziellen Laboren bestätigt werden.

“Inherited Giant Platelet Disorder” (IGPD) des Cavalier King Charles Spaniel

Eine Form der vererbten Erkrankungen ist beim Cavalier King Charles Spaniel bekannt. Studien aus Dänemark und Schweden beschreiben eine klinisch benigne Form der IGPD bei dieser Rasse. Die Erkrankung zeigt einen autosomal rezessiven Erbgang mit dem Auftreten von Riesenthrombozyten, wobei 46% der untersuchten Hunde zusätzlich eine Thrombozytopenie aufwiesen. In der Regel bleibt der Defekt asymptomatisch (29). Der Cavalier King Charles Spaniel zeigt auch andere Erkrankungen, die auf Defekte des Endothels zurückzuführen sein können. Dazu zählen Erkrankungen der Mitralklappe (als Folge einer Endokarditis), Femoralvenenverschlüsse und Fibrosen der Pulmonalarterien (30). Es ist jedoch derzeit nicht bekannt, ob diese Erkrankungen miteinander in Zusammenhang stehen.

Glanzmann-Thrombasthenie

Eine weitere hereditäre Thrombozytopathie ist die Glanzmann-Thrombasthenie. Diese Erkrankung wurde beim Menschen erstmals von Dr. Eduard Glanzmann 1918 beschrieben (31). Ursächlich handelt es sich um einen Defekt des GP IIb/IIIa – Rezeptors (Fibrinogen- Rezeptors) und des Glykoproteins alpha IIb-beta3 (32). Die Erkrankung ist beim Hund selten und wurde bei Otterhunden und Pyrenäen-Berghunden beschrieben (33).

Betroffene Hunde zeigen klinisch eine verlängerte Schleimhautblutungszeit und eine verlängerte Blutungszeit bei Verletzungen oder chirurgischen Eingriffen.

Bei den untersuchten Pyrenäen-Berghunden fielen bei allen untersuchten Aggregationsinduktoren eine deutlich reduzierte Aggregation auf und die Thrombusretraktion war nur sehr gering bis nicht vorhanden (33;34). In der Humanmedizin wird die verminderte Retraktion als Folge einer erniedrigten Myosinkonzentration und eines Defektes des kontraktilen Proteins zur Bindung von Fibrinogen beschrieben (16).

Basset Hound Thrombopathie

Eine hereditäre Erkrankung des Bassets stellt die Basset Hound Thrombopathie dar, die erstmals 1979 beschrieben wurde (35).

Es handelt sich um eine autosomal vererbte Erkrankung mit veränderter Aggregationfähigkeit der Thrombozyten. Die Basset Hounds weisen gegenüber gesunden Tieren eine physiologische Menge des Glykoprotein IIb/IIIa – Rezeptors auf, jedoch scheint eine Funktionsstörung des Rezeptors vorzuliegen (36). Weiterhin wird vermutet, dass Fehler in der Signaltransduktion zu einer fehlerhaften Aggregation führen, da gezeigt werden konnte, dass Thrombozyten von Basset Hounds nach einer Aktivierung mit ADP und Thrombin im Vergleich zu einer Kontrollgruppe eine deutlich raschere Ausschüttung von ATP aus den Speichergranula (Storage Pool) aufweisen (37). Weitere Studien zeigen, dass ein Defekt im cAMP – Metabolismus zu einem verminderten Ansprechen des Rezeptors auf Stimuli führt (38).

Die betroffenen Hunde zeigten vor allem Epistaxis, Gingivablutungen und Petechien an den Schleimhäuten und der Haut (39). Die Thrombozytenzahl, sowie der von

Willebrand-Faktor und die Screening-Gerinnungstest waren unverändert, wobei sich die Schleimhautblutungszeit verlängert zeigte (39).

„Storage Pool Diseases“ – Thrombozytenspeicherkrankheit

In der Humanmedizin werden Erkrankungen der Speichergranula, sogenannte „Storage Pool Diseases“ (deutsch: Thrombozytenspeicherkrankheiten) in 3 Gruppen unterteilt. Es kann ein Defekt oder eine Verminderung der α - Granula, der dense – Granula oder beider vorliegen (40). Die Verringerung der dense – Granula ist am häufigsten und führt zu schwerwiegenden Blutungen (41). In der Veterinärmedizin wurde diese Form der Thrombozytenfunktionsstörung bisher nur beim Cocker Spaniel nachgewiesen (42). Elektronenmikroskopisch war eine physiologische Anzahl an dense – Granula erkennbar, so dass eine fehlerhafte Ausschüttung von ADP aus den Granula vermutet wird. Aufgrund dieses ADP – Mangels treten schon bei geringen Verletzungen mittel- bis hochgradige Blutungen auf (42).

2.4.2.2. Erworbene Thrombozytopathien

Erworbene Störungen der Thrombozytenfunktion sind vielfältig und können sowohl zu einer gesteigerten als auch zu einer verminderten Reaktionsfähigkeit der Thrombozyten führen (43).

Hier sollen die möglichen Erkrankungen und Medikamente mit Einfluss auf die Thrombozytenfunktion vorgestellt werden.

2.4.2.2.1. Erworbene Störungen mit reduzierter Thrombozytenfunktion

Als Ursache für eine verminderte Thrombozytenfunktion kommen vielerlei Ursachen in Frage. So führen Insuffizienzen von Organen, Medikamente, Infektionen und neoplastische Prozesse zu einer Verminderung der Plättchenfunktion, meist ohne spontane Blutungen hervorzurufen (43). Allerdings können diese Funktionsstörungen zu massiven Hämostasestörungen nach einem Trauma oder bei Operationen führen.

Urämie

Das Vorhandensein einer Urämie führt zu einer Verminderung der Adhäsion von Thrombozyten und somit zu einer Verlängerung der Schleimhautblutungszeit. In einer Studie mit niereninsuffizienten Hunden wurde festgestellt, dass sich die Anzahl der Thrombozyten, das Volumen und die Aggregation nicht verändern, während die Adhäsion vermindert und somit und die Schleimhautblutungszeit verlängert war (44). In einer Studie von Mischke und Mitarbeitern konnte bei urämischen Hunden eine konzentrationsabhängige Aggregation mit den Aggregationsinduktoren ADP, Kollagen und Thrombin bewiesen werden. Jedoch zeigte sich, dass eine niedrigere Dosierung der Aggregationinduktoren zu einer erhöhten durchschnittlichen Aggregation führte, als die Verwendung einer mittleren Konzentration von ADP, Kollagen und Thrombin (45).

Aus der Humanmedizin ist bekannt, dass Plasma betroffener Personen adhäsive Moleküle mit niedrigem Molekulargewicht enthält, die an die Glykoprotein IIb/IIIa Komplexe binden können und so die Bindung an Fibrinogen verhindern (46).

Andere mögliche Mechanismen sind eine verminderte Sekretion von PGI₂ (Prostacyclin), welche zu einer Erhöhung des cAMPs im Thrombozyten führen und so dessen Reaktivität hemmen (47).

Leberinsuffizienz

Aus humanmedizinischen Studien ist eine verminderte Thrombozytenfunktion bei Patienten mit Leberzirrhose bekannt. Ursache hierfür ist ein Defekt in der transmembranen Signaltransduktion, welche die Rezeptorinduktion stimuliert. Dies führt zu einem verminderten Ansprechen auf die endogenen Aggregationsinduktoren (48).

Weiterhin ist die Leber als Stoffwechselorgan für die Elimination von Spaltprodukten der Fibrinolyse zuständig. Sinkt diese, können Fibrin/Fibrinogenspaltprodukte die Bindung von Fibrinogen an den Rezeptoren (GPIIa / IIIb) kompetitiv hemmen und so zu einer verminderten Thrombozytenaggregation führen.

In einer Studie wurde bei 6 Hunden mit Lebererkrankungen eine herabgesetzte Vollblutaggregation durch Arachidonsäure und Kollagen festgestellt. Es konnte allerdings keine signifikanten Unterschiede bei der Aggregation mit ADP festgestellt werden (49).

Hyperproteinämie

Infolge der mit einigen chronischen Infektionserkrankungen oder Neoplasien einhergehenden Hyperproteinämien, die meist auf einer Hypergammaglobulinämie basieren, können Hämorrhagien aufgrund von Thrombozytopathien beobachtet werden (50). Entsprechende Veränderungen finden sich zum Beispiel bei chronischen Infektionen mit Ehrlichien/Anaplasmen oder Leishmanien sowie bei Neoplasien wie dem multiplen Myelom (43).

Klinisch sind Blutungen vor allem an den Schleimhäuten festzustellen, die meist sowohl auf eine Thrombozytopathie als auch auf eine Thrombopenie als Folge der zugrundeliegenden Erkrankung zurückzuführen sind. Bei der Ehrlichiose können allerdings auch Thrombopathien ohne eine Veränderung der Thrombozytenzahl auftreten, die aus einer Hemmung der Adhäsion und der Aggregation resultieren (51).

Neoplasien

Es gibt zahlreiche, die Aggregation beeinflussende Defekte, die bei Menschen mit Leukämie oder anderen myeloproliferativen Erkrankungen gefunden wurden (43). Diese Veränderungen beziehen sich auf die Glykoproteine der Thrombozyten-Membran, die Granula oder die Signalwege der Induktoren (43).

Die Anzahl der Thrombozyten kann dabei physiologisch, erniedrigt oder auch erhöht sein. Die Thrombozytenfunktion zeigt sich während der Erkrankung unterschiedlich. Während am Anfang möglicherweise eine gesteigerte Reaktivität der Plättchen vorliegt, kann sich im Laufe der Krankheit eine Verminderung der Thrombozytenfunktion einstellen (52).

Medikamente

Medikamente greifen auf vielfältige Weise in die Gerinnung ein. Im Folgenden soll auf die Wirkung verschiedener Medikamente auf die Thrombozytenfunktion eingegangen werden.

Antiinflammatorische Medikamente

Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs) führen beim Menschen – mit Ausnahme der Acetylsalicylsäure - zu einer reversiblen Hemmung der Cyclooxygenase (53). Die Hemmung der Thrombozyten-Aggregation ist temporär und dauert abhängig von der Halbwertszeit der Medikamente selten länger als sechs Stunden (53). In der Dissertation von Richter wurde der Einfluss von Meloxicam und Carprofen auf die Blutungsneigung beim Hund untersucht. Es konnte kein Einfluss auf die Thrombozytenzahl oder eine Veränderung der Thrombozytenparameter festgestellt werden. Allerdings zeigte sich eine statistisch signifikante Verlängerung der Aggregation nach Born und einer verlängerte kappiläre Blutungszeit nach der Gabe (54).

Aufgrund von Medikamenten treten beim Hund selten spontane Blutungen auf, außer es liegt eine andere Erkrankung zugrunde. Auf den Einfluss des nichtsteroidalen Antiphlogistikums Acetylsalicylsäure wird später genauer eingegangen.

Antibiotika

Beta-Lactam-Antibiotika können an der Thrombozytenmembran binden und führen so zu einer reversiblen Hemmung der Rezeptoren der Aggregationsinduktoren und so zu einer Verminderung des durch diese Agonisten verursachten Kalziumeinstromes (55).

In einer Studie wurde der Effekt von Cephalothin auf die Thrombozytenfunktion von Hunden getestet. Die Tiere zeigten eine milde transiente Verlängerung der Schleimhautblutungszeit und eine kurzzeitige Verminderung der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation (56).

Sonstige

Barbiturate und Medikamente mit kardiovaskulärer Wirkung wie Diltiazem, Nifedipin und Verapamil führen zu einer Verminderung der Reaktivität von Thrombozyten, da sie den für die Aktivierung der Thrombozyten notwendigen Einstrom von Kalziumionen durch die Membran hemmen (57).

Der Effekt ist abhängig von der Spezies, der Dosis und der Art des Medikamentes (43). Der Einfluss von Kalziumkanalblockern auf die Thrombozyten wurde bisher allerdings nur in der Humanmedizin untersucht (57).

2.4.2.2.2. Erworbene Störungen mit gesteigerter Thrombozytenfunktion

Im Anschluss sollen Erkrankungen, welche eine gesteigerte Thrombozytenfunktion hervorrufen, erörtert werden.

Diabetes mellitus

Bei Menschen mit einem insulinabhängigen und nicht insulinabhängigem Diabetes mellitus finden sich häufig große, aktivierte Thrombozyten (58). Aufgrund dieses Befundes liegt die Vermutung nahe, dass Thrombozyten bei dieser Erkrankung zu einem prothrombotischen Stadium beitragen, an der Entwicklung einer diabetischen Vaskulopathie beteiligt sind und gegebenenfalls zu Thrombosen führen (58).

Nephrotisches Syndrom

Menschen mit nephrotischem Syndrom und gleichzeitiger Hypoalbuminämie zeigen eine gesteigerte ADP-induzierte Thrombozytenaggregation und eine erhöhte *in vivo*-Aggregation (59) (60). Bei Patienten mit nephrotischem Syndrom waren eine erhöhte P-Selektin Expression sowie und eine erhöhte β -Thromboglobulin Konzentration nachweisbar, was auf eine Hyperreagibilität der Thrombozyten hindeutete (61).

Bei Hunden mit einem nephrotischen Syndrom findet sich ebenfalls eine Steigerung der Thrombozytenaggregation nach einer Stimulation mit ADP (62). Die gesteigerte Funktion konnte durch eine Anhebung des Plasmaalbuminspiegels korrigiert werden, so dass angenommen wird, dass Albumin eine regulatorische Rolle bei der Aktivierung von Thrombozyten (62). Weiterhin kann der Verlust von Antithrombin III bei einer Niereninsuffizienz / nephrotischem Syndrom zu einer gesteigerten

Gerinnung führen (73). Auch dieses Defizit ließe sich durch eine Plasmatransfusion bessern.

Hormone

Die Gabe von Erythropoetin resultierte bei Hunden in einer erhöhten Anzahl von retikulierten Thrombozyten und einer Hyperreaktivität (63). Im Rahmen einer autoimmunhämolytischen Anämie erhöhte Erythropoetinspiegel können beim Hund zu der mit dieser Erkrankung einhergehenden erhöhten Thromboseneigung beitragen (43).

Neoplasien

Wie oben schon erwähnt wurde, können Neoplasien mit einer Reihe von Thrombozytenfunktionsstörungen in Zusammenhang gebracht werden. So wiesen 59 Hunde mit Neoplasien eine gesteigerte Aktivität der Thrombozyten und eine vermehrte Ausschüttung von ATP auf (64). Ein weiterer möglicher Pathomechanismus ist die Expression von P-Selektin und somit eine Aktivierung der Thrombozyten wie es bei Patienten mit renalen Karzinomen nachgewiesen werden konnte (65).

Dirofilariose

Hunde mit einer Herzwurminfektion zeigten eine Erhöhung der ADP-induzierten Plättchenaggregation (66). Ätiologisch sind die durch den Erreger hervorgerufenen Endotheldefekte und seltener die Hämolyse von Erythrozyten für die gesteigerte Reaktivität der Thrombozyten verantwortlich.

Asthma

Bei Menschen mit bronchialem Asthma findet sich häufig ein erhöhter Kalziumspiegel infolge einer gesteigerten Freisetzung aus den internen Speichern der Thrombozyten. Es wird vermutet, dass dieser erhöhte Kalziumspiegel zu einer Verstärkung des Phosphatidylinositol-Signalweges der Thrombozyten führt (43). Während eines asthmatischen Anfalls lassen sich der Plättchenfaktor 4 (PFA4) und β -Thromboglobulin vermehrt im Plasma und der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit nachweisen, was auf eine Thrombozytenaktivierung hinweist. Diese Faktoren führen - wie auch die Verstärkung des thrombozytären Signalweges - zu einer erhöhten Reaktivität der Thrombozyten (43). Das therapeutisch eingesetzte Theophyllin

verhindert die Hyperreagibilität durch eine Erhöhung des cAMP-Spiegels, der die erhöhte Kalziumfreisetzung aus den Thrombozyten verhindert (67).

2.4.2.2.3. Einfluss einer Anämie auf die Thrombozytenfunktion

Erkrankungen, die eine Anämie ohne eine gleichzeitige Beeinflussung der Thrombozytenzahl oder -funktion hervorrufen, sind selten. Wenn eine physiologische Reaktivität der Thrombozyten vorliegt, ist auch ein normaler Verlauf der Aggregation zu erwarten. Es ist allerdings bei Menschen und Hunden bekannt, dass Geräte wie z.B. der platelet function analyzer (PFA-100), deren Messungen auf einer Verschlusszeit (clot-Bildung) beruhen, bei Anämien artifiziell verlängerte Verschlusszeiten infolge einer verminderten Viskosität des Blutes erzielen und somit eine Thrombozytopathie vortäuschen können (68).

2.4.2.2.4. Einfluss von Heparin auf die Thrombozytenfunktion

Heparine sind sulfatierte Mucopolysaccharide, die in den basophilen Granula der Mastzellen in Lunge, Leber und anderen Geweben gebildet und durch Degranulation freigesetzt werden (24). Das in der Medizin überwiegend eingesetzte hochmolekulare (unfraktionierte) Heparin hat eine Molekülmasse zwischen 3000 und 30000 Daltons (durchschnittlich 15000 Dalton) (69). Das ebenso kommerziell erhältliche niedermolekulare Heparin, welches beim Menschen in zunehmendem Maße Verwendung findet, zeigt ein durchschnittliches Molekulargewicht von 4000 bis 8000 Dalton (70). Das Molekulargewicht ist verantwortlich für den unterschiedlichen Einfluss des Heparins auf Gerinnung und auf die Geschwindigkeit der Elimination aus dem Körper. So werden Moleküle mit hohem Molekulargewicht schneller aus dem Körper eliminiert als solche mit geringerem Gewicht. Heparin kann enteral nicht aufgenommen werden und muss daher entweder subcutan oder intravenös verabreicht werden (69).

Die gerinnungshemmende Wirkung des Heparins beruht auf einer Komplexbildung mit Antithrombin III (AT III), was die durch AT III katalysierte Hemmung der aktivierten Gerinnungsfaktoren um das 1000fache beschleunigt. Anschließend trennt

sich das Heparin von AT III und steht für erneute Reaktionen zur Verfügung. Diese Form der Inaktivierung gilt für das unfractionierte Heparin, allerdings nicht für das niedermolekulare Heparin, welches keine Komplexe zwischen ATIII und Thrombin bilden kann (71). Das niedermolekulare Heparin wirkt lediglich durch eine Inaktivierung des aktivierten Faktor X, die auf eine alleinige Bindung mit ATIII zurückzuführen ist (Abbildung 4).

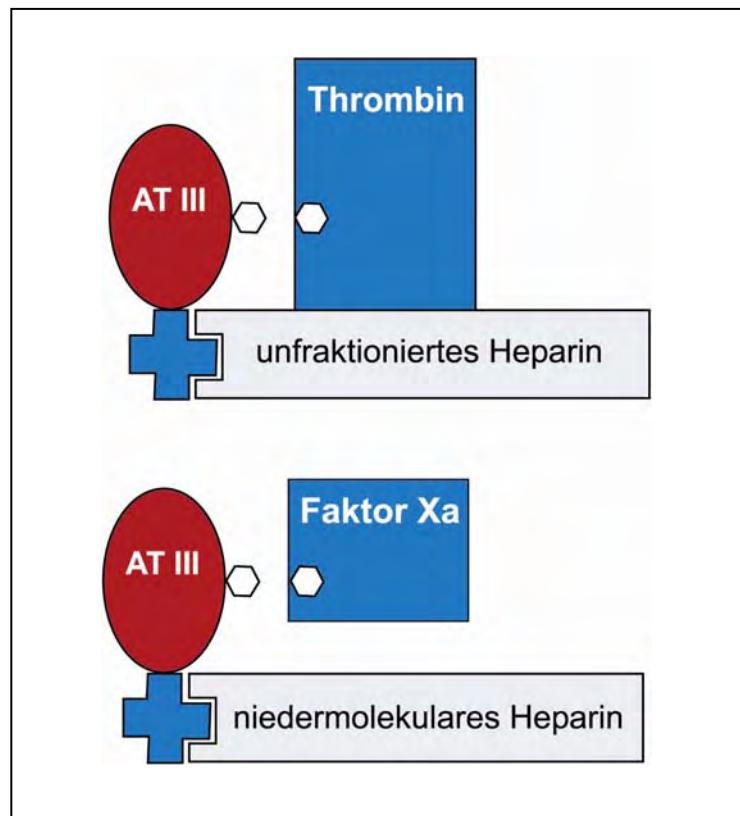


Abbildung 4: Wirkungsweise des unfractionierten und niedermolekularen Heparins
Graphik entlehnt von Day und Mitarbeitern (71)

Abkürzungen: AT III = Antithrombin III, Faktor Xa = aktivierter Faktor X

Die direkte Wirkung von Heparin auf Thrombozyten ist dosisabhängig. So resultierte eine *in vitro* Zugabe einer physiologischen Heparindosis von 0,25 IE/ml zu Blutproben gesunder Mensch in einer Aktivierung des GPIIb/IIIa – Rezeptors, der Expression von P-Selektin und einer gesteigerte Plättchenaggregation (72). In einer zweiten Studie zeigte sich, dass Heparin bei einer höheren Dosis (100 IE/ml) einen potenten Inhibitor der Thrombozytendegranulation darstellt (73).

Es ist schon länger bekannt, dass die durch Thrombin induzierte Thrombozytenaktivierung und -aggregation mit Heparin gehemmt werden kann (74). Thrombin besitzt eine Bindungsstelle für den Glykoprotein Ib - Rezeptor auf den Thrombozyten, die durch Heparin kompetitiv hemmbar ist, was die Aktivierung von Thrombozyten verhindert (75).

In einer Studie von Mischke und Nimmerfall wurde der Einfluss von Heparin auf die Aggregation von caninen Thrombozyten getestet. Nach einer einmaligen Heparininjektion von 1000 IE/kg KG konnte nach 4 Stunden eine Heparin-Plasmakonzentration von 1,2 IE/ml erreicht werden. Die Aggregation nach Born zeigte mit den Aggregationsinduktoren ADP und Kollagen jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Ausgangswert und der Probe nach Behandlung (76). Weiterhin konnte dargestellt werden, dass die Einwirkzeit von Heparin eine Rolle bei der Thrombozytenhemmung führt. Leuser und Mitarbeiter konnten zeigen, dass in einer Untersuchung beim Schwein über den Versuchsverlauf hinweg bei der gleichen Heparindosierung eine zunehmende Hemmung der Thrombozytenaggregation zu beobachten war (77).

2.4.2.2.5. Einfluss von Acetylsalicylsäure auf die Thrombozytenfunktion

Acetylsalicylsäure (ASS) führt zu einer irreversiblen Hemmung der Cyclooxygenase-1 (COX-1) und somit zu einer Hemmung der Produktion von Prostaglandinen und dem die Thrombozytenaggregation induzierenden Thromboxan A₂. Bei Hunden bewirkt Acetylsalicylsäure eine Hemmung der durch Kollagen hervorgerufenen Aggregation, während die Aggregation durch ADP oder Thrombin nicht beeinflusst wird. In einer Studie wurde bei Hunden eine Dosis von 6 mg/kg (+/-2) benötigt, um die Thrombozytenaggregation um 50% zu hemmen (78).

Dem widersprechen Ergebnisse von Grauer und Mitarbeitern, die mittels Vollblutaggregometrie basierend auf der Impedanzmethode keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der mit Kollagen induzierten Thrombozyten-Aggregation von mit Aspirin behandelten Beagles (2x täglich 3,5 mg/kg über 7 Tage) und der Kontrollgruppe (ebenfalls Beagles) feststellen konnten (79).

Beim Menschen ist ein unterschiedliches individuelles Ansprechen auf Aspirin bekannt, ebenso kann der Einfluss auf die Hemmung der Thrombozyten beim

gleichen Individuum über die Zeit variieren (80): Eine sogenannte „Aspirinresistenz“ wird in der Humanmedizin unterschiedlich definiert. Zum einen beinhaltet sie Patienten, die unter Therapie mit Aspirin trotzdem thrombembolische Erkrankungen entwickeln, zum anderen Patienten bei denen eine unzureichende Hemmung der Thrombozytenaggregation erreicht wird (80). Für dieses Phänomen scheint es verschiedene Ursachen zu geben. In einer Studie von Zimmermann *et al.* (2003) zeigte eine Behandlung mit Aspirin über 7-10 Tage keinen hemmenden Einfluss auf die *ex-vivo* Aktivität von Thrombozyten. Nachgewiesen werden konnte jedoch eine 16-fache Erhöhung der COX-2 Aktivität in Thrombozyten, die auf einen erhöhten Turn-over zurückzuführenden war. Das Nichtansprechen ist somit vermutlich auf die COX-2 mediierte Produktion von TXA2 zurückzuführen (81). Ebenso wurde in einer humanmedizinischen Studie der Metabolit 11-dehydro-TXB2 untersucht. Hierbei handelt es sich um einen stabilen Metaboliten des TXA2, der über den Urin ausgeschieden wird. Bei Patienten unter langfristiger Behandlung mit Aspirin konnte eine hohe Urinkonzentration dieses Stoffes nachgewiesen werden, so dass eine inkomplette Hemmung der Thrombozyten oder eine Produktion von TXA2 aus anderen Geweben als Thrombozyten angenommen wird (82).

Aspirin hemmt die Thrombozytenaggregation ausschließlich über die Hemmung von Thromboxanen, allerdings können auch erhöhte Scherkräfte in thrombotischen Gefäßen oder eine erhöhte Catecholaminkonzentration im Blut zu einer Thrombose trotz Aspirinbehandlung führen, was z.B. bei Patienten mit Artherosklerose beobachtet wird (83).

2.5. Thrombozytenfunktionsdiagnostik

Aufgrund des technischen Aufwandes ist die Thrombozytenfunktionsmessung kein Standardverfahren in der tierärztlichen Praxis. Allerdings stehen in speziellen Laboratorien unterschiedliche Geräte und Möglichkeiten zur Funktionsbestimmung zur Verfügung.

In diesem Kapitel soll eine Übersicht über die möglichen Verfahren zur Thrombozytenfunktionsmessung gezeigt werden.

2.5.1. Schleimhautblutungszeit

Die Schleimhautblutungszeit ist ein klinischer Globaltest zur Testung der Thrombozytenfunktion *in vivo*, der zwar zeitaufwändig, aber aufgrund weniger notwendiger Hilfsmittel eine hohe Praxisrelevanz besitzt. Es kann eine Störung der Thrombozytenfunktion bei physiologischer Thrombozytenzahl erkannt werden, während für Blutungsneigungen durch Thrombozytopenien die Zählung der Thrombozyten durch diverse Hämatologiesysteme oder auch eine direkte Auszählung auf einem Blutaussstrich die besseren Verfahren sind.

Jergens und Mitarbeiter zeigten, dass die Bestimmung der Schleimhautblutungszeit an der Lefzeninnenseite beim Hund standardisiert durchführbar ist. Mit einer Stichinzision wurde eine durchschnittliche Blutungszeit von 2.62 ± 0.49 Minuten beim gesunden Hund ermittelt (84). Da diese Untersuchung beim wachen Hund zu deutlichen Abwehrbewegungen führen kann, wurde von Nolte *et al.* eine standardisierte Methode beim Hund entwickelt, bei der die Blutungszeit an einer Zehe der Vordergliedmaße bestimmt wird. Zu diesem Zweck wird der Hund in Seitenlage verbracht, die Punktionsstelle rasiert und mit einer durchblutungsfördernden Salbe vorbereitet. Mittels einer Blutdruckmanschette kann während der gesamten Untersuchungszeit ein standardisierter Druck von 70mmHg stabil aufrechterhalten werden (85). Da die Schleimhautblutungszeit nur interpretierbar ist, wenn sie unter Standardbedingungen bestimmt wird, ist dieses Untersuchungsverfahren unter Praxisbedingungen relativ zeitaufwendig. Aus diesem Grund wurden Geräte zur Untersuchung der primären Hämostase wie der PFA-100

entwickelt, die zwar teurer, aber in ihrer Durchführung weniger arbeitsintensiv und zeitaufwendig sind. Auf dieses Gerät wird später noch genauer eingegangen.

2.5.2. Thrombozytenaggregationsmessung nach Breddin

Die Methode ist eine einfache Möglichkeit, ohne großen technischen Aufwand die Thrombozytenfunktion zu testen, wobei allerdings nur eine gesteigerte Thrombozytenfunktion mittels einer visuellen Beurteilung der Aggregationsneigung unter dem Mikroskop festgestellt werden kann (86).

In ein silikoniertes Rundkörnchen wird plättchenreiches Plasma pipetiert und 10 Minuten in einem Wasserbad bei 37°C rotiert. Nach einer 1:10 – Verdünnung mit isotoner Kochsalzlösung wird 1ml der so erhaltenen Lösung auf einen Objektträger aus silikonisiertem Glas oder auch Kunststoff aufgebracht. Dieser wird 30 Minuten in eine feuchte Kammer gelegt, bis die Thrombozyten sedimentiert sind. Die Plasma-Kochsalz-Lösung wird abgegossen und das Präparat mit zittrathaltiger isotoner Kochsalzlösung gespült. Nach Lufttrocknung und Fixation mit Alkohol wird der Objektträger nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt. Danach kann eine Differenzierung zwischen 5 Stufen der Aggregation vorgenommen werden. Die Stufen reichen von einzeln gelagerten Plättchen (Stufe 1) bis zur Bildung großer Aggregate (Stufe 5), bei denen einzelne Plättchen nicht mehr voneinander zu unterscheiden sind (87).

2.5.3. Thrombelastographie / Resonanzthrombelastographie

Die Thrombelastographie stellt einen Thrombozytenfunktionstest dar, mit dem Vollblut ohne eine weitere Zugabe von Aggregationsinduktoren gemessen werden kann. Nach Einfüllen von Vollblut in das Gerät kommen die Faktoren Einfüllzeit, Reaktionszeit, Gerinnselbildungszeit, maximale Thrombusfestigkeit und maximale Thrombuselastizität zur Auswertung. Alternativ kann diese Messung auch mit Citratblut unter Zugabe von Kalziumcitrat erfolgen (88).

Das Blut wird in eine Edelstahlküvette eingefüllt, in die ein Edelstahlzylinder eintaucht. Durch die zunehmende Bildung von Fibrin kommt es zur Vernetzung zwischen dem Zylinder und der Küvettenwand, so dass die Küvette beginnt, sich mit

dem Zylinder mit zu drehen. Die Drehung des Zylinders wird über die Zeit als spindelförmige Kurve aufgezeichnet (88).

Die Resonanzthrombelastographie stellt eine Weiterentwicklung der Thrombelastographie dar. In der Resonanzthrombelastographie können die Effekte der Fibrinbildung und der Thrombozytenaktivität voneinander unterschieden werden. Diese erlaubt eine genauere Differenzierung und eignet sich daher als Screeningtest für Patienten mit hämorrhagischer Diathese (89). Zur Auswertung kommen die Gerinnungs- oder Reaktionszeit, die Fibrinbildungszeit, die Amplitude des Fibrinogenschenkels und die Amplitude des Thrombozytenschenkels (Abbildung 5). Bei der Resonanzthrombelastographie führt ein abgesenktes Metallpendel eine Orbitalschwingung in rekalkifiziertem Citratblut aus, deren Schwingungsradius kontinuierlich in Form einer Kurve aufgezeichnet wird. Durch die Elastizität des sich bildenden Fibringerinnsels kommt es zu einer Erhöhung der Eigenfrequenz der Pendelschwingungen in den Resonanzbereich der Erregungsfrequenz und somit zu einer deutlichen Zunahme des Schwingungsradius (Anstieg der Kurve, Fibrinschenkel, Abbildung 5 F). Die nachfolgende Abnahme des Schwingungsradius (Abstieg der Kurve, Thrombozytenschenkel, Abbildung 5, P) erklärt sich durch eine erhöhte Kontraktionsspannung durch die eingelagerten Thrombozyten.

Es lassen sich auch komplexe Hämostasestörungen, wie zum Beispiel Hinweise auf eine disseminierte intravasale Gerinnung erfassen (89). Milde Hämostasestörungen können aber auch bei einem physiologischen Ergebnis nicht ausgeschlossen werden (89).

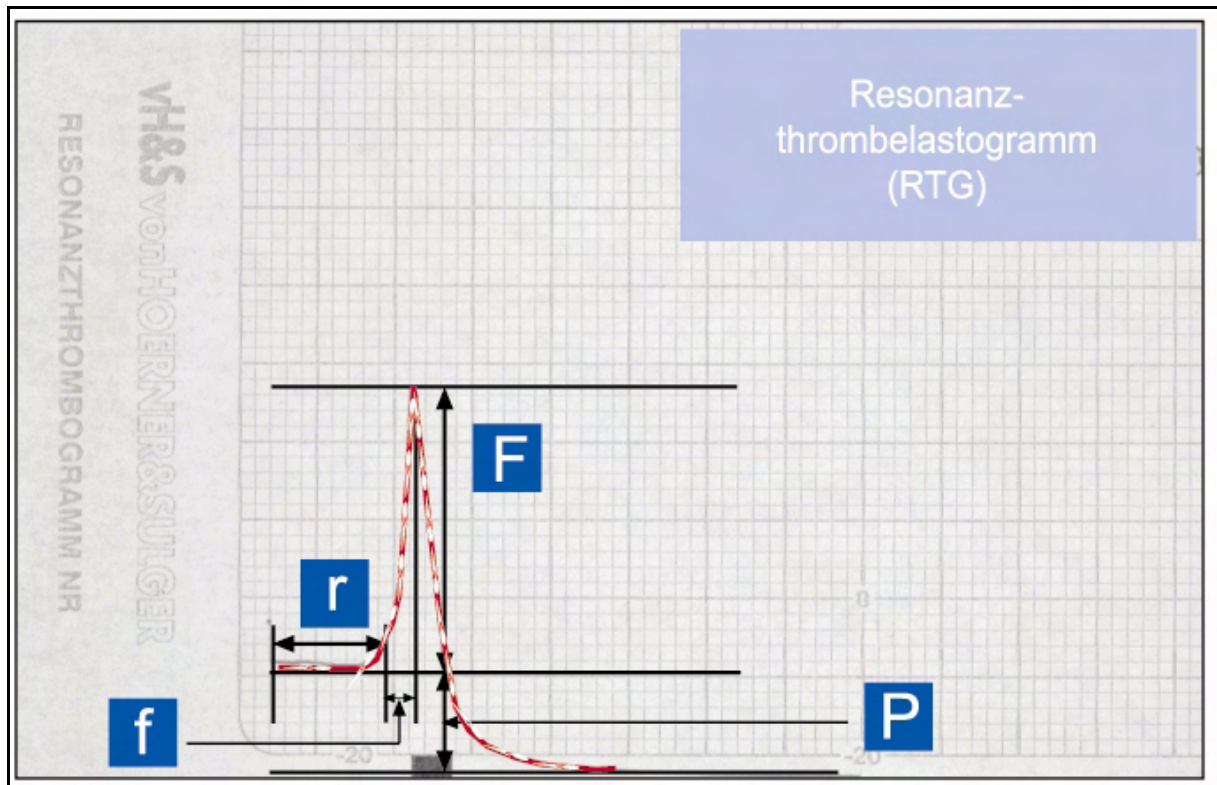


Abbildung 5: Resonanzthrombelastogramm

r: Reaktionszeit (Zeit bis zu dem Zeitpunkt, an dem sich die Kurve um 1mm von der Basislinie entfernt hat)

f: Fibrinbildungszeit (Aufstiegszeit des Fibrinschenkels)

F: Amplitude des Fibrinschenkels

P: Amplitude des Thrombozytenschenkels

2.5.4. Thrombozytenaggregationsmessung nach Born

Die turbidimetrische Messung der Aggregation wurde das erste Mal 1962 von Born beschrieben (90).. Es handelt sich um eine Messung der Änderung der optischen Dichte in plättchenreichen Plasma nach Zugabe von Aggregationsinduktoren. Die Gewinnung des plättchenreichen Plasmas erfolgt durch Zentrifugation aus Citratblut. Eine Portion des Citratblutes oder des plättchenreichen Plasmas wird zur Zentrifugation von plättchenarmen Plasma herangezogen, das als Kontrolle für eine 100%ige Lichttransmission gilt. Nach Zugabe eines Aggregationsinduktors kommt es zur Verklumpung der Thrombozyten in der Küvette. Durch die Entstehung der Thrombozytenaggregate, die sich am Boden des Gefäßes sammeln, klärt sich das

Plasma. Die Abnahme der Trübung wird mit einem Dekoder wahrgenommen und als prozentuale Aggregation auf einem Monitor dargestellt (Abbildung 6).

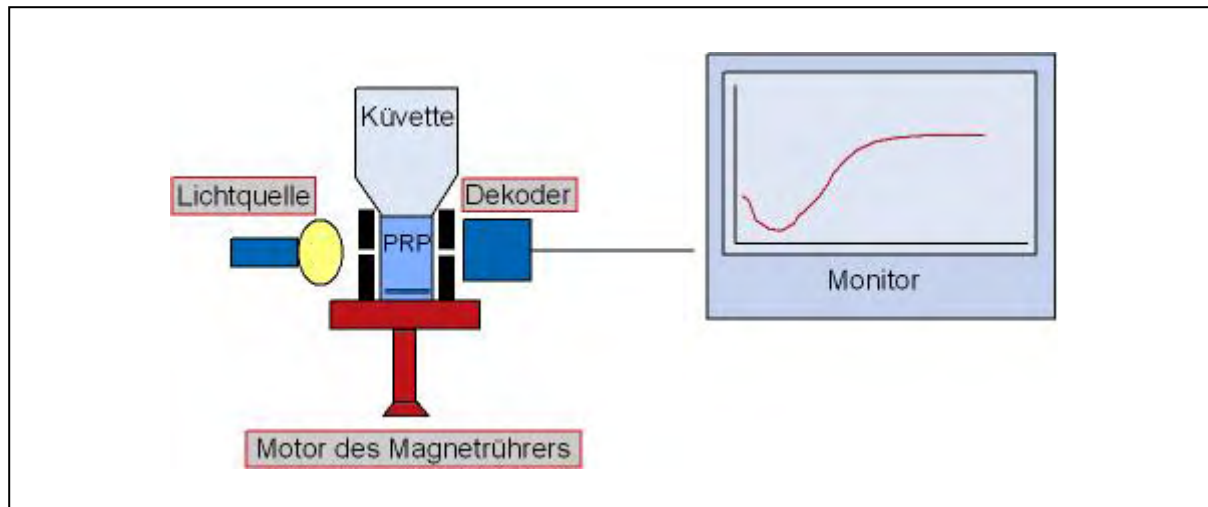


Abbildung 6: Darstellung des Messprinzips der Aggregometrie nach Born

Abkürzung: PRP = plättchenreiches Plasma

Mit diesem Verfahren kann nicht nur die maximale Aggregation bestimmt werden, sondern auch die Konformationsänderung (shape change, Abbildung 7) der Thrombozyten sowie der zeitliche Verlauf der Aggregation (90).

In einem Artikel von Breddin werden einige Hinweise zur Standardisierung der Methode gegeben (91). Den größten Einfluss auf die Wiederholbarkeit der Ergebnisse hat die Behandlung der Probe vor der eigentlichen Messung als auch die Auswahl des Aggregationsinduktors (91). So wird berichtet, dass die Verwendung von Kollagen, bei unterschiedlichen Spezies zu verschiedenen Resultaten führt. Weiterhin ist eine Einstellung der Thrombozyten auf eine Standard-Anzahl pro ml Probe sowohl umständlich, als auch unnötig und führt zu einer zusätzlichen Aktivierung der Thrombozyten (91).

Die Nachteile der Aggregometrie nach Born sind das große Probenaufkommen zur Herstellung des plättchenreichen Plasmas und die Kosten für die Anschaffung eines speziellen Gerätes, dem Aggregometer (Abbildung 8). Weiterhin wird diskutiert, ob Thrombozyten in ihrem physiologischen Milieu (Vollblut) und in plättchenreichem Plasma unterschiedlich reagieren (16). Ebenso besitzt diese Technik bei starken Färbungen des Plasmas wie beispielsweise durch Hämolyse, Ikterus und starke Lipämie nur eine eingeschränkte Aussagekraft (16).

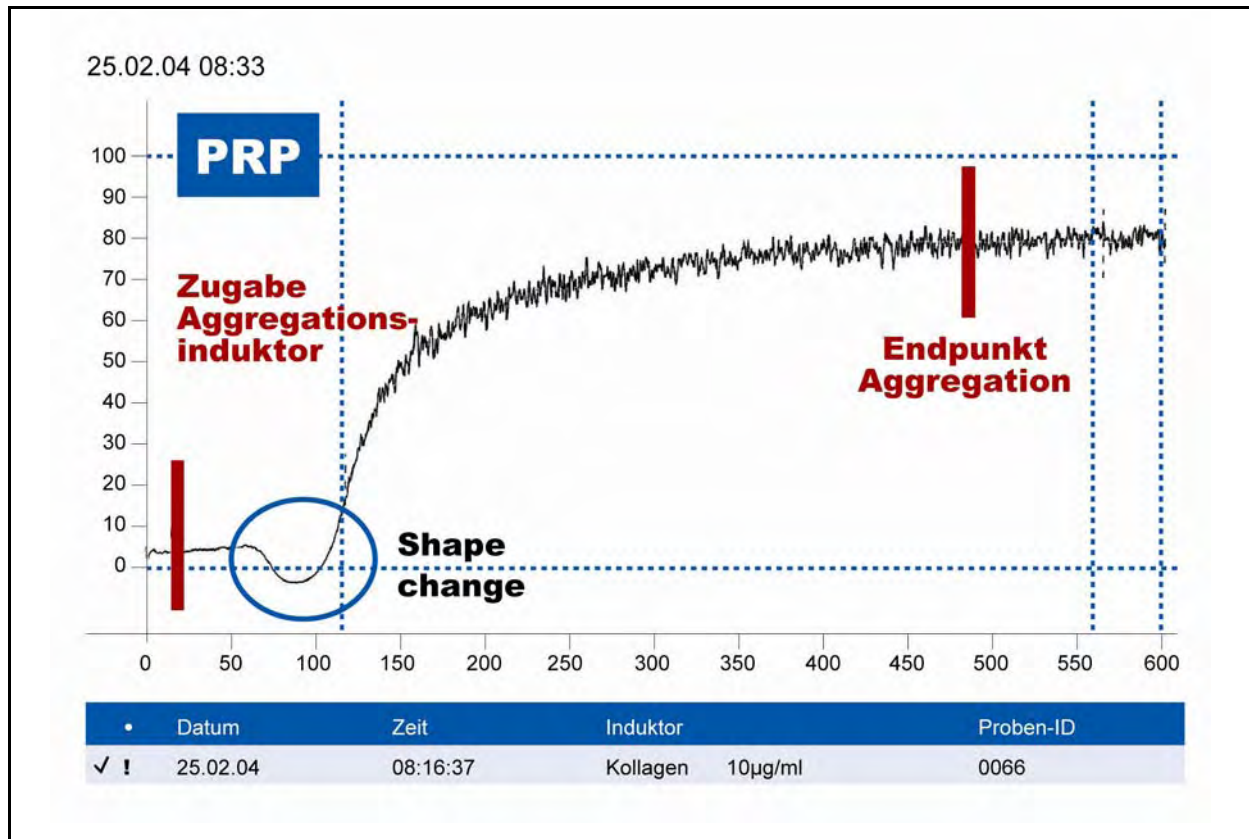


Abbildung 7: Darstellung einer Aggregationskurve nach Born mit Verwendung von plättchenreichem Plasma (PRP) und dem Aggregationsinduktor Kollagen in einer Konzentration von 10µg/ml



Abbildung 8: Aggregometer AACT 4™ der Firma Labor, Ahrensburg

2.5.5. Impedanzmethode

Die von Cardinal und Flower beschriebene Methode beruht auf einer Änderung der elektrischen Impedanz, die durch die Anlagerung von Thrombozyten an einer Elektrode hervorgerufen wird (92). Die Impedanzmessung kann sowohl mit Vollblut, als auch mit plättchenreichem Plasma erfolgen.

Im plättchenreichen Plasma liefert diese Methode mit den gängigen Aggregationsinduktoren ähnliche Ergebnisse wie die turbidimetrische Bestimmung nach Born (92).

Der Vorteil dieser Methode ist, dass durch die Verwendung von Vollblut nur ein geringes Probenvolumen benötigt wird und keine Aktivierung der Thrombozyten durch die Zentrifugation erfolgt und die Messung bleibt unbeeinflusst durch Veränderungen des Plasmas, wie z.B. Lipämie (93). Die Methode erfasst allerdings nicht die Konformationsänderung (shape change) der Thrombozyten und die Messdauer ist relativ lang (bis 15 Minuten), was als Nachteil dieser Methode angesehen werden kann (92). Weiterhin kann eine geringe Aktivierung der Thrombozyten, welche nicht in einer irreversiblen Aggregation resultiert nicht detektiert werden, so dass die Interpretation von pathologischen Veränderungen schwierig bleibt und die niedrige Sensitivität dieser Methode in der Humanmedizin zu einem Wechsel auf andere Messmethoden geführt hat (93).

2.5.6. Das Plättchenfunktionsanalysegerät PFA - 100™

Der PFA-100™ wurde zur *in vitro* Untersuchung der primären Hämostase als Ersatz für die zeitaufwendige Bestimmung der Schleimhautblutungszeit entwickelt und sowohl für den Menschen (94) als auch für den Hund evaluiert (68).

Bei dem PFA-100™ findet eine Messmethode Verwendung, welche ein defektes Blutgefäß imitieren und so die Bestimmung der *in vivo* Blutungszeit simulieren soll. Durch eine biologisch aktive Membran wird Blut angesaugt. Für die Beschichtung der Membran können zwei verschiedene Kartuschen gewählt werden, die entweder mit den Aggregationsinduktoren Kollagen/ADP oder Kollagen/Epinephrin beschichtet sind (68). Die Stimulation der Thrombozyten durch die biologisch aktiven Stoffe bewirkt eine Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten auf der Kollagenoberfläche. Durch die daraus resultierende Anlagerung der Thrombozyten auf die Membran kommt es zu einer zunehmenden Verengung und schließlich einem vollständigem Verschluss der Membranöffnung. Der Test gilt dann als beendet und das Ergebnis wird als Verschlusszeit in Sekunden angegeben.

Der PFA-100™ wurde bei Hunden mit verschiedenen Erkrankungen zur Bestimmung der *in vitro* Blutungszeit eingesetzt. Weiterhin wurde im Rahmen dieser Studie der Effekt einer Vorbehandlung gesunder Hunde mit Acetylsalicylsäure (ASS) untersucht. So konnte nach einer intravenösen Gabe von 20mg/kg ASS eine 1,3fache Verlängerung der mittels Kollagen und ADP-Kartuschen gemessenen Verschlusszeiten festgestellt werden (68). Es handelt sich hier um ein standardisiertes Verfahren, das einfach durchzuführen ist. Allerdings ist die Verschlusszeit vom Hämatokritwert beeinflusst, da bei Werten $<0,25\text{ l/l}$ eine signifikante Verlängerung der Verschlusszeit eintritt (68). Ein gewisser Nachteil ist weiterhin, dass die Art und Konzentration des Aggregationsinduktors im Gegensatz zur Aggregometrie nicht frei wählbar ist. Der zeitliche Ablauf der Thrombozytenaggregation lässt sich mit dem PFA-100™ ebenfalls nicht nachvollziehen, da am Ende der Untersuchung nur die Verschlusszeit angegeben wird.

2.5.7. Aggregationsberechnung nach der Bestimmung der Thrombozyten im Vollblut

Die Bestimmung der Thrombozytenfunktion mit den zuvor genannten Methoden ist arbeitsintensiv, technisch schwierig und/oder nur nach Anschaffung von speziellen Geräten notwendig. Aus diesem Grund ist das Erkennen von Thrombozytopathien in der Praxis schwierig, zumal die Proben nicht in ein externes Labor versendet werden können. Diese Problematik war der Auslöser für die Entwicklung einer neuen Methode der Vollblutaggregometrie mit dem Hämatologiegerät H*1™ (Firma Bayer), dem Vorläufermodell des ADVIA 120™ (95). Im Rahmen dieser Studie wurde die Thrombozytenaggregation bei Patienten mit Myokardinfarkten unter Therapie mit Urokinase, Acetylsalicylsäure, Nitroglycerin und Heparin im Vergleich zu einer Kontrollgruppe getestet. Die Bestimmung der Aggregation beruhte auf einer Vollblutaggregation mit dem Hämatologiesystem H*1™ unter Verwendung des Induktors ADP im Vergleich zu der Methode nach Born. Die Vollblutaggregometrie basierte auf der Messung der Thrombozytenzahl aus Citratvollblut zum Zeitpunkt Null [t(0)] und acht Minuten [t(8)] nach Zugabe des Aggregationsinduktors am H*1™. Die Aggregation errechnete sich dann aus dem prozentualen Absinken der Thrombozytenzahl nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Thrombozyten } t(0_{\text{min}}) - \text{Thrombozyten } t(8_{\text{min}})}{\text{Thrombozyten } (0_{\text{min}})} \times 100 = \text{Prozent der Aggregation}$$

Bei den Patienten mit Myokardinfarkt ergab sich eine gute Korrelation zwischen der Vollblutaggregometrie und der Methode nach Born ($r=0,855$) während bei den gesunden Probanden eine mäßige Korrelation zwischen den beiden Verfahren ($r=0,612$) ermittelt wurde (95).

Der Nachteil dieser neuen Methode der Vollblutaggregometrie ist, dass der Verlauf der Aggregation inklusive des Shape Changes nicht darstellbar ist, da lediglich die

prozentuale Aggregation am Endpunkt der Messung bestimmt wird. Die Vorteile dieser Methode liegen in ihrer sehr einfachen Durchführung, die in jedem Labor und vielen Praxen erfolgen kann, da prinzipiell jedes Hämatologiesystem einsetzbar ist. Ebenso entfällt die aufwendige Herstellung von plättchenreichem Plasma. Durch die Verwendung von Vollblut wird auch die durch Zentrifugation und Pipetieren hervorgerufene Aktivierung der Thrombozyten verhindert.

2.5.7.1. Bestimmung der Thrombozytenzahl durch die Hämatologiesysteme ADVIA 120™ und VetABC™

ADVIA 120™

Das Hämatologiesystem ADVIA 120™ (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH) arbeitet nach dem Prinzip der Laser gestützten Durchflusszytometrie mit den zwei optischen Messgrößen Absorption und Streulicht. Es wird ein Laser als Lichtquelle eingesetzt und das von den zu messenden Zellen gestreute Licht mittels Photodetektoren in elektrische Signale umgewandelt (96). Die Darstellung der Messergebnisse erfolgt mittels zweidimensionaler Punktwolken (dot-plots) in sogenannten Zytogrammen.



Abbildung 9: Hämatologiesystem ADVIA 120™ der Firma Siemens Healthcare Diagnostics GmbH

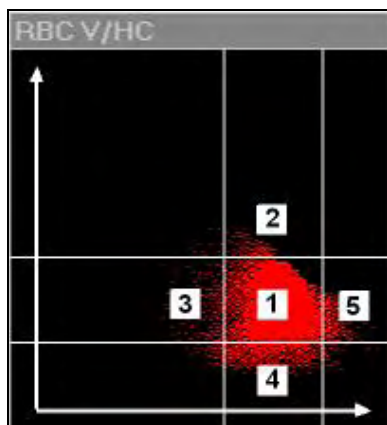


Abbildung 10: Erythrozyten-Scattergramm des ADVIA 120™

Auf der x – Achse wird der Hämoglobingehalt aufgetragen, auf der y – Achse die Größe der Zellen

- 1: normochrome, normozytäre Erythrozyten
- 2: normochrome, makrozytäre Erythrozyten
- 3: hypochrome, normozytäre Erythrozyten
- 4: normochrome, mikrozytäre Erythrozyten
- 5: hyperchrom, normozytäre Erythrozyten

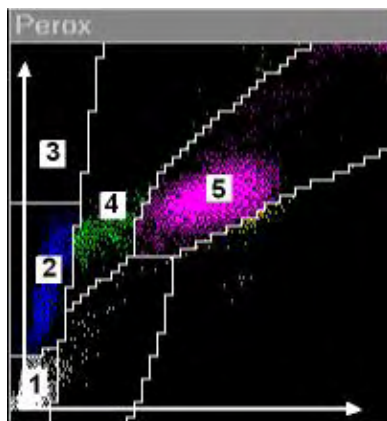


Abbildung 11: Perox-Scattergramm des ADVIA 120™

Auf der x – Achse wird der Peroxidasegehalt aufgetragen, auf der y – Achse die Größe der Zellen

- 1: Detritus (Rauschen)
- 2: Lymphozyten
- 3: große peroxidasenegative Zellen (LUC)
- 4: Monozyten
- 5: Neutrophile Granulozyten

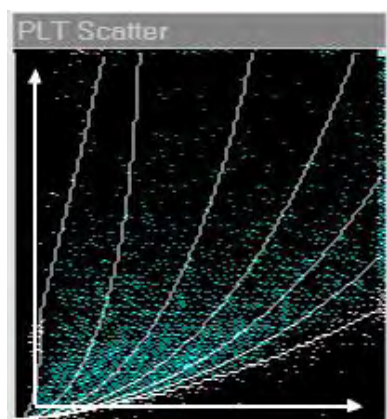


Abbildung 12: PLT (Thrombozyten) -Scattergramm des ADVIA 120™

Auf der x – Achse wird die Granularität der Thrombozyten aufgetragen und auf der y – Achse die Größe

VetABC™

Das Hämatologiesystem VetABC™ arbeitet nach der Impedanzmethode die auch als Coulter-Prinzip bezeichnet wird. Hier wird mit einer gut leitenden Elektrolytlösung verdünntes Blut durch eine winzige Messöffnung gesaugt, an die eine Gleichspannung angelegt ist. Der Durchtritt der Zellen bewirkt eine kurzfristige Widerstandsänderung, die als Signal gemessen wird. Diese Änderung ist proportional zum Zellkernvolumen, muss allerdings für jede Zellen und für jede Tierart einen Schwellenwert überschreiten, um detektiert werden zu können (97). Die Anzahl der einzelnen Impulse ergibt die Zahl der gezählten Partikel.



Abbildung 13: Hämatologiesystem VetABC™ der Firma Scil animal health care, Viernheim

2.6. Thrombozytenparameter des ADVIA 120™

Die Besonderheit des Hämatologiesystems ADVIA 120™ ist seine 2D Thrombozytenmessmethode, mit der es sich deutlich vom Vorgängermodell H*1™ unterscheidet (98). Beim H*1™ basierte die Thrombozytenmessung lediglich auf den Signalen des Niedrigwinkelstreulichts, das eine Aussage über das Zellvolumen ermöglicht, wogegen beim ADVIA 120™ eine Kombination aus Kleinwinkelstreulicht (2-3°) und Großwinkelstreulicht (5-15°) erfolgt, so dass zusätzlich zu dem Thrombozytenvolumen eine Messung der in den Thrombozyten vorhandenen Granula und somit ihres Aktivierungsgrades möglich ist (98). Daraus ergeben sich einige neue, gerätespezifische Parameter, deren Referenzbereiche im Rahmen einer Studie von Moritz und Mitarbeitern für die Spezies Hund evaluiert wurde (99).

In mehreren human- und tiermedizinischen Studien konnte belegt werden, dass der mittlere interne Thrombozytenbestandteil (MPC) einen sehr geeigneten Parameter zur Messung der Granularität und somit des Aktivierungsgrades von Thrombozyten darstellt. Es konnte mittels Vergleichsuntersuchung eine gute Korrelation zwischen dem auf eine Degranulation infolge Aktivierung hindeutenden Absinken des MPCs und der mit Thrombozytenaktivierung assoziierten vermehrten Expression von P-Selektin auf den Thrombozyten nachgewiesen werden (100) (101) (102). Boos und Mitarbeiter konnten ebenfalls zeigen, dass bei der Aktivierung der Thrombozyten durch hypertensive Phasen eine signifikante Veränderung der Thrombozytenparameter mittlere Konzentration innerer Thrombozytenbestandteile (MPC), Mittleres Thrombozytenvolumen (MPV) und Verteilungsbreite der inneren Thrombozytenbestandteile (PCDW) im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe zu verzeichnen war (103).

2.7. Aggregationsinduktoren

Endogene Aggregationsinduktoren werden nach Aktivierung des Thrombozyten ausgeschüttet und führen ihrerseits zu einer Anziehung und Anheftung von weiteren Thrombozyten an einen bestehenden Thrombus. Bei einigen Säugetierspezies wurden mögliche Agonisten weitgehend erforscht und zeigen - mit Ausnahme von Kollagen und Thrombin, welche eine schnelle und irreversible Aggregation hervorrufen - eine speziesspezifische breite Varianz in ihrer Wirkung auf Thrombozyten (23). Der Einfluss der Agonisten ist abhängig von verschiedenen Faktoren, wie der Ausprägung des Kanalsystems im Thrombozyten, Art und Anzahl der entsprechenden Rezeptoren und die Fähigkeit, Thromboxan A₂ zu synthetisieren. So können Spezies mit einem ausgeprägten Kanalsystem (open canalicular system) selbst auf niedrige Dosen von ADP durch eine Extravasation mit einer Ausschüttung von reaktiven Faktoren aus den Dichten Granula (dense bodies) reagieren und so eine gesteigerte Reaktivität der Thrombozyten zeigen, während Spezies mit einem weniger ausgeprägten Kanalsystem, wie zum Beispiel das Rind, bei niedrigen ADP-Dosen eine reversible Aggregation zeigen, die erst bei hohen Dosen irreversibel wird. Auch zeigen kernhaltige Thrombozyten von Vögeln und Reptilien keine Reaktion auf ADP (23). Nach der Zugabe von Serotonin und Epinephrin weisen Säugerthrombozyten keine - oder nur eine geringe - Aggregation auf. Serotonin induziert nur einen shape change bei Ratten, Meerschweinchen und Hund. Bei Menschen, Kaninchen, Katzen, Schweinen, Schafen, Kühen und Pferden führt es zu einer schwachen Aggregation (104). Auf Epinephrin sprechen nur menschliche, feline und canine Thrombozyten an (23). Arachidonsäure und Thromboxan sind starke Agonisten bei Mensch, Meerschweinchen und Kaninchen, dagegen reagieren Thrombozyten von Pferden nur schwach und die von Rindern und Ratten gar nicht. Arachidonsäure kann ferner bei Hunden rasseabhängig ein starker Aggregationsinduktor sein (23).

Es muss jedoch festgehalten werden, dass eine Aktivierung von Thrombozyten *in vitro* die Reaktion *in vivo* nicht vollständig imitieren kann, da diese sich auch nach geringer Stimulation durch die Ausschüttung endogener Agonisten aktivieren können und somit aggregieren (23).

Die Aggregation von caninen Thrombozyten wurde in verschiedenen Studien sowohl mit einem Vollblutaggregometer als auch mit der Methode nach Born untersucht.

Hierbei stellten sich in der Aggregometrie nach Born die Aggregations-Induktoren Kollagen, ADP und Thrombin als geeignet heraus (45). Mit den Konzentrationen von 25mmol/l ADP, 10µg/ml Kollagen und 1 IU/ml Thrombin ließen sich bei gesunden Hunden Aggregationen von über 80% erzielen. Ristocetin und Epinephrin zeigten in den eingesetzten Konzentrationen keine ausreichende Aggregation (105). In der Vollblutaggregometrie mittels Vollblutaggregometer führten Kollagen in einer Konzentration 1µg/ml und ADP mit 10µmol zu den konstantesten Aggregationen bei verschiedenen Spezies (106). Bei hohen Konzentrationen eines Aggregationsinduktors kann eine milde Thrombozytenfunktionsstörung kaschiert werden, daher ist es in einigen Fällen notwendig eine geringere Induktorkonzentration zu wählen (16).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Studienaufbau

Auswahl und Konzentration des Aggregationsinduktors

In Voruntersuchungen wurden verschiedene Aggregationsinduktoren in der Aggregometrie nach Born in unterschiedlichen Konzentrationen miteinander verglichen. Es stellte sich – wie in der Literatur beschrieben – heraus, dass Kollagen, ADP und Thrombin die stabilsten Ergebnisse zeigten. Aufgrund der möglichen reversiblen Aggregatbildung durch ADP und der Nichteignung von Thrombin zur Vollblutaggregometrie (Gerinnungsbildung) wurde Kollagen in der Konzentration von 10µg/ml in beiden Methoden eingesetzt.

Als zweites wurde der Einfluss der Konzentration auf die Aggregation der Thrombozyten getestet, da in der Literatur die ideale Konzentration von 1µg/ml für die Vollblutaggregation (106) und von 10µg/ml für die Aggregometrie nach Born (16) angegeben wird, beide Methoden in dieser Studie jedoch die gleiche Konzentration an Aggregationsinduktor enthalten sollten. Daher wurden die Konzentrationen 0,5µg/ml, 1µg/ml, 5µg/ml und 10µg/ml in der Vollblutaggregation getestet. Die Messung der Aggregation erfolgte am ADVIA 120™ in je 1ml Citratblut. Die prozentuale Aggregation wurde aus dem Abfall der Thrombozyten errechnet. Gemessen wurde vor der Zugabe des Kollagens und nach acht Minuten.

Für die weiteren Untersuchungen wurden die Probanden in 3 Gruppen unterteilt

Gruppe 1

Zuerst wurden 31 klinisch gesunde Hunde untersucht, um die Referenzbereiche für die einzelnen eingesetzten Geräte zu etablieren und die Änderung der Thrombozytenparameter durch die Aktivierung zu untersuchen.

Gruppe 2

Bei Proben von sechs Hunden wurde durch Zugabe von plättchenreichem Plasma eine Anämie simuliert (Hämatokritwert zwischen 0,15 und 0,20 l/l), um deren Einfluss auf die Untersuchungsmethode bei physiologischer Thrombozytenfunktion zu untersuchen.

Gruppe 3

Hier wurde der Einfluss von Heparin auf die Proben von sechs Hunden geprüft. Zuerst erfolgte der Vergleich der Aggregation unter Zugabe von drei unterschiedlichen Heparinkonzentrationen zu einer unbehandelten Kontrolle. Als zweites fand ein Vergleich zwischen den einzelnen Konzentrationen und dem Einfluss einer Einwirkzeit des Antikoagulanz von 60 Minuten statt.

Gruppe 4

Analog zu den Untersuchungen mit Heparin fanden die Analysen mit Acetylsalicylsäure statt. Ausgewertet wurden ebenfalls Blutproben von sechs Hunden. Die Zugabe beider Antikoagulanzen erfolgte dabei *in vitro*.

In allen Gruppen wurde bei allen Untersuchungszeitpunkten ein Blutausschrieb zur Beurteilung etwaiger Veränderungen und zur Verifizierung der durch die Messung erhaltenen Ergebnisse angefertigt. Ausgewertet wurden die Proben der Gruppe 1 (gesunde Hunde) zum Zeitpunkt 8 Minuten nach Aggregation („Probe 8“).

3.2. Geräte, Reagenzien, Materialien und Medikamente

- ADVIA 120™, Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Erlangen, Deutschland
- Vet ABC™, Fa. Scil animal care company, Viernheim, Deutschland
- APACT 4™ inklusive Software (Aggregations-Programm für MS – Windows® Version 1.0, 1998), LabiTec Labor BioMedical Technologie GmbH, Ahrensburg, Deutschland
- Resonanzthrombelastogramm RTG 801™, Fresenius Medizintechnik, Bad Homburg, Deutschland
- Amelung Coagulometer KC4A™, Fa. ABW Medizin und Technik GmbH, Lemgo, Deutschland
- Cobas mira S™, Hoffmann – LaRoche Ltd, Basel, Schweiz
- Cobas mira plus™, Hoffmann – LaRoche Ltd, Basel, Schweiz
- Pentra 400™ Abx-Horiba Europe GmbH, Neuhausen, Deutschland
- Hettich Rotana P™, Hettich GmbH und CoKG, Tuttlingen, Deutschland

- Heraeus Sepatech Biofuge 15™, Hettich GmbH und CoKG, Tuttlingen, Deutschland
- Hettich Mikro 20™, Hettich GmbH und CoKG, Tuttlingen, Deutschland
- Statistiksoftware: Graph pad prism 4.0, Graph pad Software Inc., San Diego, USA
- EDTA (1,3ml K3E), Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, Nr.: 41.1504.005
- Heparin (1,3ml LH), Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, Nr.: 41.1503.005
- Citrat (1,3ml 9NC), Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, Nr.: 41.1506.005
- Blutsenkungsmonovette (BSG 2ml)), Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, Nr.: 47.410
- Micro Tubes, Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, Nr.: 72.690
- 5ml Polystyrene Round Bottom tubes, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland, Nr.: 352054
- 12ml Natrium : Citrat 0,1 M, Mischverhältnis 1:10, Kabe, Nümbrecht – Eisenroth, Deutschland, Nr.: 71002
- Kollagen aus der Pferdesehne 100µg / ml, mölab Hilden, Deutschland, Lot-Nr: 118022D
- Feather Blood Lancet, Produkte für Medizin AG, Köln, Nr: 02.030.00.000
- Microlance 3, 18G, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland, Nr.: 304622
- Aspisol® , Fa. Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
- Heparin – Natrium 25.000®, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland

3.3. Probanden

Im ersten Teil der Studie wurden insgesamt 45 gesunde Hunde untersucht, von denen 31 in die Studie eingingen. Die Probanden wurden als Blutspender oder zum Gesundheitscheck an der Klinik für Kleintiere, Innere Medizin, der Justus-Liebig-Universität Gießen vorgestellt.

Eingeschlossen wurden klinisch unauffällige Probanden, deren labordiagnostische Parameter (Hämatologie, klinische Chemie und Gerinnung) innerhalb der laborspezifischen Referenzbereiche lagen. Im Falle eines Auslandsaufenthaltes

wurden die Tiere auf die Erkrankungen Babesiose, Ehrlichiose, Leishmaniose und Dirofilariose getestet und nur bei negativem Ergebnis in die Studie aufgenommen. Im zweiten Teil der Studie erfolgte eine Untersuchung des *in vitro* Einflusses von Heparin und Acetylsalicylsäure auf die Thrombozytenaggregation an Proben von Patienten der vorangegangenen Untersuchung, die einen unauffälligen Aggregationswert zeigten.

3.4. Durchführung der Untersuchungen

Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Untersuchung mindestens 12 Stunden nüchtern, um Messungenauigkeiten durch lipämisches Plasma zu vermeiden. Routinemäßig erfolgte die Erhebung der Anamnese, eine klinische Untersuchung bei der auch die Schleimhautblutungszeit bestimmt wurde und eine hämatologische und blutchemische Untersuchung, sowie die Bestimmung der Gerinnungszeiten.

3.4.1. Bestimmung der Blutungszeit

Die Bestimmung der Schleimhautblutungszeit erfolgte an der Lippeninnenseite mit einer Blutungslanzette. Es wurden zwei definierte Stichinzisionen gesetzt und das austretende Blut vorsichtig mittels Mulltupfer aufgesaugt, ohne die Einstichstelle direkt zu berühren. Der Endzeitpunkt der Messung war beim vollständigen Stillstand der Blutung erreicht.

3.4.2. Blutprobenentnahme und Aufbewahrung

Die Blutentnahme erfolgte bei allen Patienten aus der Vena jugularis. Zur Entnahme wurde eine 18G Kanüle verwendet. Um eine Aktivierung der Thrombozyten durch die Freisetzung von Gewebsthromboplastin im Zusammenhang mit der Gefäßpunktion zu vermeiden, wurden die ersten 2ml Blut verworfen. Danach wurden 20ml Citratblut für die Herstellung von plättchenreichem Plasma für die Untersuchungen mit der Methode nach Born und eine 5ml Spritze zur Befüllung von drei Röhrchen für die Vollblutaggregometrie, die mit jeweils 100 µl Citrat 3,13%

präpariert waren, entnommen. Jedes dieser Röhrchen wurde mit 1ml Vollblut befüllt. Weitere 10ml Blut wurden zur Befüllung der Heparin-, EDTA- und Serumröhrchen für die routinemäßigen Laborbestimmungen entnommen.

Die Entnahme und Befüllung der Röhrchen erfolgte immer in der gleichen Reihenfolge. Alle Untersuchungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Proben für die Aggregometrie und die Vollblutaggregation wurden 30min aufbewahrt, bevor weitere Untersuchungen erfolgten. In der Literatur finden sich Angaben, nach denen Thrombozyten unter Umständen an einem „platelet shock“ leiden und in den ersten 30 Minuten nach der Blutentnahme eine schlechte oder keine Reaktivität auf Aggregationsinduktoren zeigten. Diese Hyporeaktivität kann mit einer Wartezeit von 30 Minuten nach Blutentnahme vermieden werden (107).

3.4.3. Hämatologische und klinisch chemische Blutuntersuchungen

Bei allen Patienten wurden zum Ausschluss zugrunde liegender Organerkrankungen folgende Laborparameter bestimmt:

Die hämatologische Untersuchung beinhaltete die Bestimmung von Hämatokrit, Anzahl der Thrombozyten, Leukozytenzahl und Differenzialblutbild.

In den blutchemischen Untersuchungen wurden die Nierenparameter (Harnstoff, Kreatinin), Elektrolyte (Natrium [Na], Kalium [K], Chlorid [Cl], Phosphat [P]), Leberwerte (Alkalische Phosphatase [AP], Alaninaminotransferase [ALT], Aspartataminotransferase [AST], Glutamatdehydrogenase [GLDH], γ -Glutamyltransferase [γ -GT] Cholesterin, Triglyceride, Bilirubin, Glukose, Gallensäuren basal), Serumproteine (Albumin, Globulin), Pankreasparameter (α -Amylase, Lipase) und die Entzündungsparameter (Fibrinogen und Blutsenkungsgeschwindigkeit) untersucht.

In die Gerinnungsdiagnostik gingen die Parameter Prothrombinzeit (PT), aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT), die Thrombinzeit (TZ) und ein Resonanzthrombelastogramm (RTG) ein.

3.4.3.1. Untersuchung der Thrombozytenaggregation an gesunden Probanden (Gruppe 1)

3.4.3.1.1. Bestimmung der Thrombozytenfunktion mittels Aggregometer

Die Bestimmung der Aggregation am APACT 4™ erfolgte mit plättchenreichem Plasma (PRP). Zur Herstellung des Plasmas wurde das Citratblut in einer Zentrifuge mit 190g für 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipetiert und am ADVIA 120™ gemessen, um die Anzahl der Thrombozyten im Plasma zu bestimmen.

Etwa 2ml des Citratblutes wurden zentrifugiert, um plättchenarmes Plasma zur Bestimmung des Nullwertes am Aggregometer zu erhalten. Nach Festlegung des Ausgangspunktes mit 250µl plättchenarmen Plasma erfolgte die Messung von 225µl PRP mit Zugabe von 25µl Kollagen. Die Datenaufzeichnung fand auf einem Computer mit Hilfe der mitgelieferten Software (Aggregations-Programm für MS – Windows® Version 1.0, 1998) statt. Der Endzeitpunkt der Messung lag bei acht Minuten.

Bei einer fehlenden Aggregation oder unglaublichen Aggregationswerten wurde die Messung mit der identischen Probe wiederholt.

3.4.3.1.2. Bestimmung der Thrombozytenaggregation nach Ermittlung der Thrombozytenzahl durch beide Hämatologiesysteme

Die Messungen wurden analog zu den Messzeitpunkten der Aggregometrie zu den Zeitpunkten 0 und 8 Minuten durchgeführt. Die Befüllung der Probenröhrchen ist in der Abbildung 14 dargestellt. Die Bestimmung der Ausgangsthrombozytenzahl fand zum Zeitpunkt 0 in der Citratprobe statt. Zum Zeitpunkt 8 Minuten erfolgte eine Messung aller drei Proben. Die Röhrchen wurden einmal in der Minute vorsichtig geschwenkt. Die Menge des Aggregationsinduktors Kollagen betrug bei allen Messungen 10µg/ml.

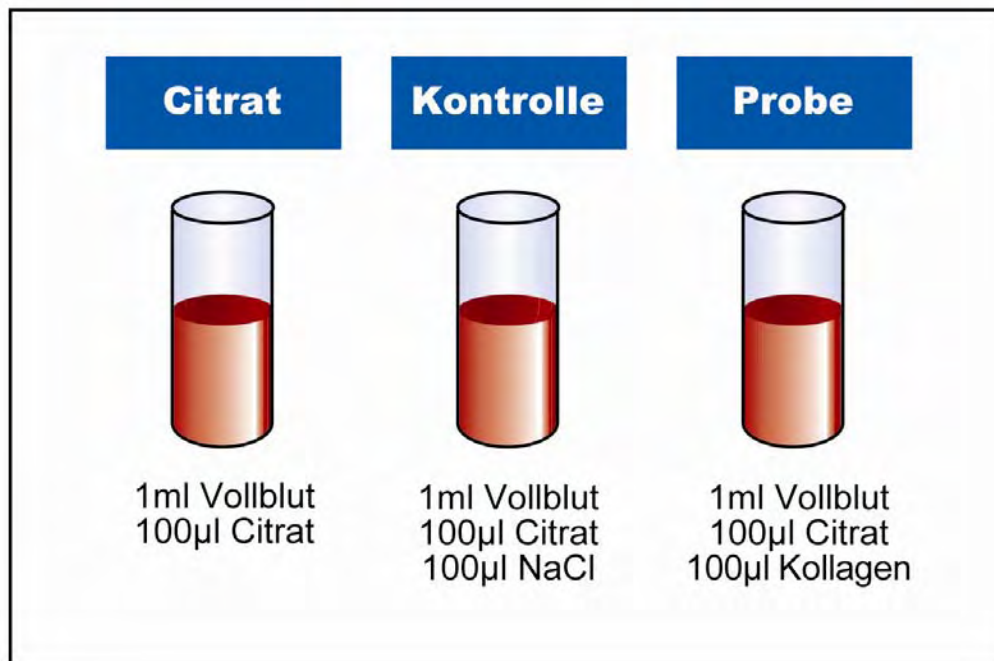


Abbildung 14: Darstellung der Befüllung der einzelnen Probengefäße

3.4.3.1.3. Auswertung der Thrombozytenparameter des ADVIA 120™

Neben der prozentualen Aggregation wurden die Thrombozytenparameter des ADVIA 120™ vor und nach Aktivierung und Aggregation verglichen. Ziel war die Aktivierung durch Kollagen anhand der aufgeführten Parameter nachzuweisen. Zusätzlich wurde das Thrombozyten Scattergramm (PLT Scatter) und das Leukozyten Scattergramm des ADVIA 120™ auf mögliche Veränderungen nach der Aktivierung der Thrombozyten untersucht.

In die Auswertung gingen folgende Parameter ein:

Tabelle 1: Übersicht über wichtige Thrombozytenparameter des ADVIA 120™ inklusive deren englischer und deutscher Bezeichnung

Englische Bezeichnung incl. Abkürzung	Deutsche Bezeichnung
Mean platelet volume (MPV)	Mittleres Thrombozytenvolumen
Platelet distribution width (PDW)	Thrombozytenverteilungsbreite
Mean platelet component concentration (MPC)	Mittlere Konzentration innerer Thrombozytenbestandteile
Platelet component distribution width (PCDW)	Verteilungsbreite der mittleren Konzentration innerer Thrombozytenbestandteile
Large platelets (large PLT)	Große Thrombozyten
Clumps	Thrombozytenaggregate

3.4.3.2. *In vitro*-Veränderungen

3.4.3.2.1. *In vitro*-Veränderung Anämie (Gruppe 2)

Um die Situation einer Anämie zu simulieren, wurde 50ml Citratblut wie oben beschrieben aus der Jugularvene entnommen und 10ml des Citratblutes für die Thrombozytenfunktionsmessung am Aggregometer herangezogen. Nach Zentrifugation von 30ml Blut konnte plättchenreiches Plasma (PRP) zur Verdünnung des Blutes abpipetiert werden. Der Hämatokritwert wurde auf 0,15 – 0,19 l/l eingestellt. Die Thrombozytenzahl lag bei über 150 Zellen x 10⁹ / Liter.

Die Messungen wurden wie oben beschrieben mit unverdünntem Blut und mit der künstlich hergestellten Anämie durchgeführt.

3.4.3.2.2. *In vitro*-Veränderung durch Heparin (Gruppe 3)

Die Heparinisierung des entnommenen Citratblutes erfolgte mit 0,2 IU/ml, 1,0 IU/ml, 10,0 IU/ml unfraktioniertem Heparin.

Die Messungen von nicht heparinisiertem und heparinisiertem Blut wurden zum Zeitpunkt Null und nach 60 Minuten Einwirkzeit durchgeführt.

3.4.3.2.3. *In vitro*-Veränderung Acetylsalicylsäure (Gruppe 4)

Die Acetylsalicylsäure wurde als Injektionslösung zum Citratblut in den Konzentrationen 5µl/ml (entspricht 0,5mg/ml), 10µl/ml (entspricht 1mg/ml), 20µl/ml (entspricht 2mg/ml) Acetylsalicylsäure zugegeben.

Die Messungen erfolgten direkt nach Zugabe der Acetylsalicylsäure nach 60 Minuten Einwirkzeit.

3.4.4. Statistische Untersuchungen

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software Graph pad prism 4.0[®], Graph pad Software Inc., San Diego, USA. Zur Anwendung kamen der Kolmogorow – Smirnov – Test zur Testung auf Normalverteilung, der students t-test, eine einfaktorielle Varianzanalyse (one way – ANOVA) und zweifaktorielle Varianzanalyse (two way – ANOVA) und bei statistischer Signifikanz ein Bonferroni's Multiple Comparison Test. Bei nicht normalverteilten Daten wurde der Dunn's Multiple Comparison Test als post – Test verwendet. Die Darstellung der Daten erfolgte mittels linearer Regression, Bland-Altman- Diagrammen, Dot - und Box and Whisker –Plots.

Normalverteilte Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung und die nicht normalverteilten Resultate als Median und range angegeben. Die Ergebnisse galten ab einem p-Wert $<0,05$ als statistisch signifikant. Die Referenzbereiche für die einzelnen Geräte berechneten sich aus dem Mittelwert abzüglich bzw. zuzüglich der 1,96fachen Standardabweichung.

4. ERGEBNISSE

Von 45 untersuchten Hunden wurden 4 Hunde aufgrund eines Herzgeräusches und ein Hund wegen einer bestehenden Hypothyreose aus der Studie ausgeschlossen.

Bei drei Hunden konnte keine ausreichende Thrombozytenzahl im PRP erreicht werden und zwei Hunde zeigten eine fehlerhafte Aggregation trotz einer normalen Anzahl von Thrombozyten im plättchenreichen Plasma. Diese Tiere schieden ebenfalls aus der Studie aus. Ein Hund konnte aufgrund einer geronnenen Citratprobe in der Vollblutaggregation nicht in die Auswertung aufgenommen werden. Bei drei von 45 Hunden (6,7%) erfolgte die Messung zunächst mit einer anderen Charge des Kollagens (Lot Nummer 10444335), jedoch konnten damit keine glaubwürdigen Aggregationen ermittelt werden. Allerdings zeigte sich eine physiologische Aggregationen nach dem Wechsel auf die zuvor verwendete Charge (Lot Nummer 118022D), die daraufhin im Rahmen der gesamten Studie verwendet wurde.

Schlussendlich wurden von den 45 untersuchten Hunden 31 Hunde in die Statistik aufgenommen (68,9%).

Weiterhin waren in der Methode nach Born bei fünf von 31 Hunden (16,1%) Wiederholungsmessungen notwendig, da in der ersten Messung keine oder nur einer geringe Aggregation erreicht wurde. Nach erneuter Messung der gleichen Probe mit der gleichen Charge des Kollagens war eine physiologische Aggregationskurve nachweisbar.

Die routinemäßig durchgeführten Blutuntersuchungen (Hämatologie, Blutchemie und Gerinnung) wiesen geringgradige Veränderungen auf, die auf physiologische Schwankungen zurückzuführen waren. Einige Probanden zeigten leicht erhöhte Aktivitäten der α -Amylase und Lipase im Blutplasma, hatten aber keinerlei klinischen Zeichen wie Durchfall, Erbrechen, verminderte Futteraufnahme oder Störung des Allgemeinbefindens, die hinweisend auf eine Pankreatitis waren.

4.1. Ergebnisse bei unveränderten Blutproben (Gruppe 1)

4.1.1 Probanden

Von den 15 männlichen Hunden waren 7 und von den 16 weiblichen 5 kastriert. Das mediane Alter lag bei 4 Jahren (1 – 13 Jahre). In der Rasseverteilung war der Beagle mit 12 Tieren am häufigsten vertreten, gefolgt von den Mischlingen mit 8 Tieren. Weiterhin gingen Proben von drei deutschen Schäferhunden, zwei Golden Retrievern, zwei Rauhaardackeln, zwei Border - Collies und jeweils einem Terrier und einem Weimaraner in die Untersuchung ein.

4.1.2. Schleimhautblutungszeit

Die Schleimhautblutungszeit konnte bei 29 der 31 in die Studie aufgenommenen Hunden bestimmt werden. Bei zwei Probanden war die Blutungszeit an der Lefzeninnenseite aufgrund mangelnder Kooperation der Hunde nicht untersuchbar. Der Mittelwert lag bei $56,4 \pm 15,7$ Sekunden.

4.1.3. Vergleich der prozentualen Aggregation bei unterschiedlichen Kollagenkonzentrationen

In der nachfolgenden Abbildung und Tabelle wird der Einfluss der Kollagenkonzentration auf die prozentuale Aggregation dargestellt.

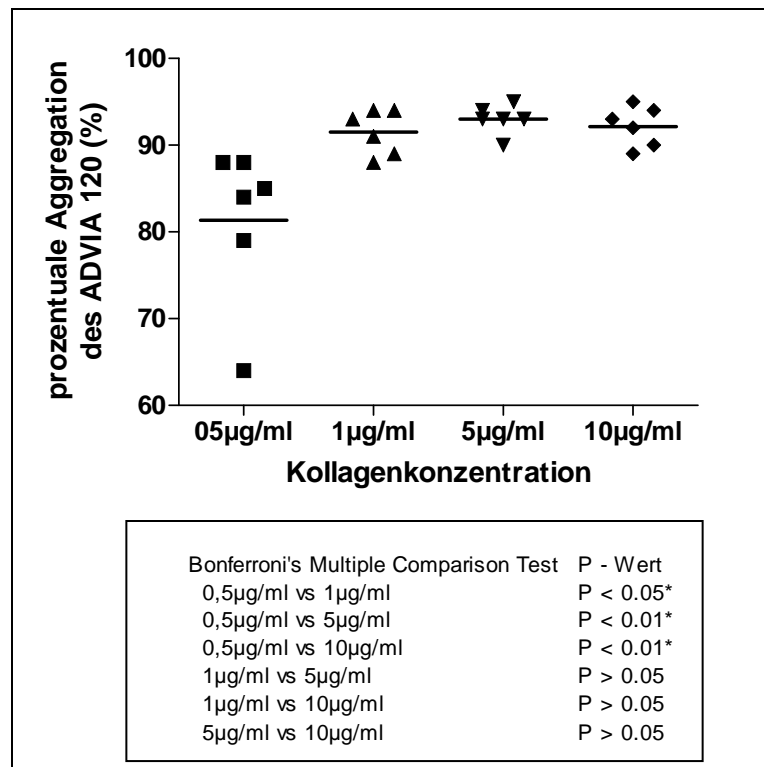


Abbildung 15: Vergleich der mittels ADVIA 120™ bestimmten prozentualen Aggregation bei unterschiedlichen Kollagenkonzentrationen inklusive Bonferroni's Multiple Comparison Test. Die eingeblendete Linie gibt den Mittelwert an. Die Messergebnisse der einzelnen Probanden sind jeweils als Punkte dargestellt.

Abkürzung * = statistisch signifikanter Unterschied zur niedrigsten Konzentration

Tabelle 2: Darstellung des Mittelwertes und der Standardabweichung (SD) der prozentualen Aggregation bei verschiedenen Kollagenkonzentrationen

	0,5µg/ml	1µg/ml	5µg/ml	10µg/ml
Mittelwert	81,33%	91,50%	93,00%	92,17%
SD	9,14	2,59	1,67	2,32

Vergleicht man die Konzentrationen miteinander, zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied bei allen Konzentrationen im Vergleich zur Konzentration von 0,5µg/ml ($P < 0,05$ / $0,01$), zwischen den Konzentrationen 1µg/ml, 5µg/ml und 10µg/ml lassen sich keine statistisch signifikanten Abweichungen zwischen den Messungen feststellen ($P > 0,05$).

4.1.4. Prozentuale Aggregation der Geräte im Vergleich

Abbildung 16 zeigt die mit dem APACT 4™ Aggregometer, dem ADVIA 120™ und dem VetABC™ gemessenen prozentualen Aggregationen gesunder Hunde im Vergleich.

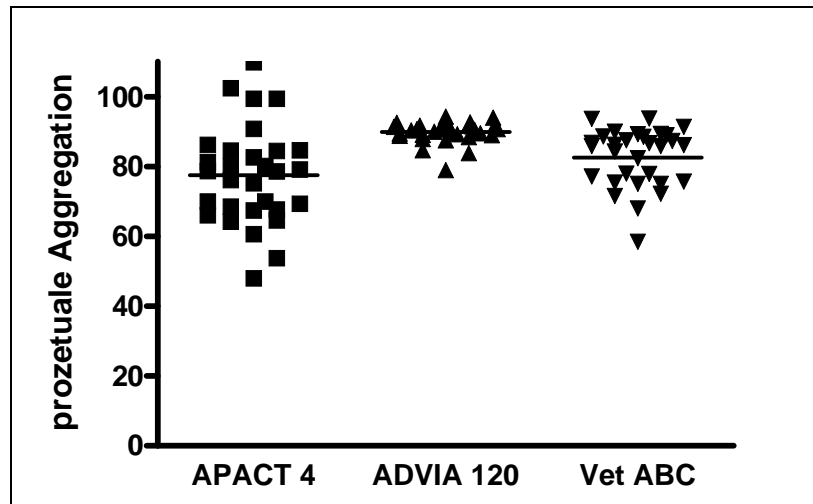


Abbildung 16: Dot blot – Darstellung der Einzelwerte der prozentualen Aggregation der Geräte im Vergleich (n=31 gesunde Hunde). Die eingeblendete Linie gibt den Mittelwert an.

Tabelle 3: Aufzeichnung des Mittelwertes und der Standardabweichung der prozentualen Aggregation der drei Geräte im Vergleich

	APACT 4	ADVIA 120	VetABC
Mittelwert	77,46%	89,88%	82,54%
SD	14,08	3,06	8,35

Wie in der Abbildung 16 und Tabelle 3 ersichtlich ist, ergibt die mittels ADVIA 120™ gemessene prozentuale Aggregation den höchsten Mittelwert, gefolgt von den Resultaten des VetABC™ und des APACT 4™ Aggregometer. Weiterhin wird deutlich, dass die mit dem ADVIA 120™ ermittelte prozentuale Aggregation bei gesunden Hunden die geringste Standardabweichung (Tabelle 3) und Streuung (Abbildung 16) der Werte zeigt.

Basierend auf den Resultaten können die Referenzbereiche für die einzelnen Geräte errechnet werden. Dieser liegt für die Aggregometrie nach Born mittels APACT 4™ Aggregometer bei Werten zwischen 49% – 105%, den ADVIA 120™ zwischen 84% - 96% und für den VetABC™ bei 69 - 96%.

4.1.4.1. Vergleich der prozentualen Aggregation nach Messung mit dem APACT 4™ Aggregometer und dem ADVIA 120™

In den folgenden Abbildungen werden die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse und die Abweichung der Differenz vom Mittelwert der mittels APACT 4™ Aggregometer und dem ADVIA 120™ erhaltenen Resultate dargestellt.

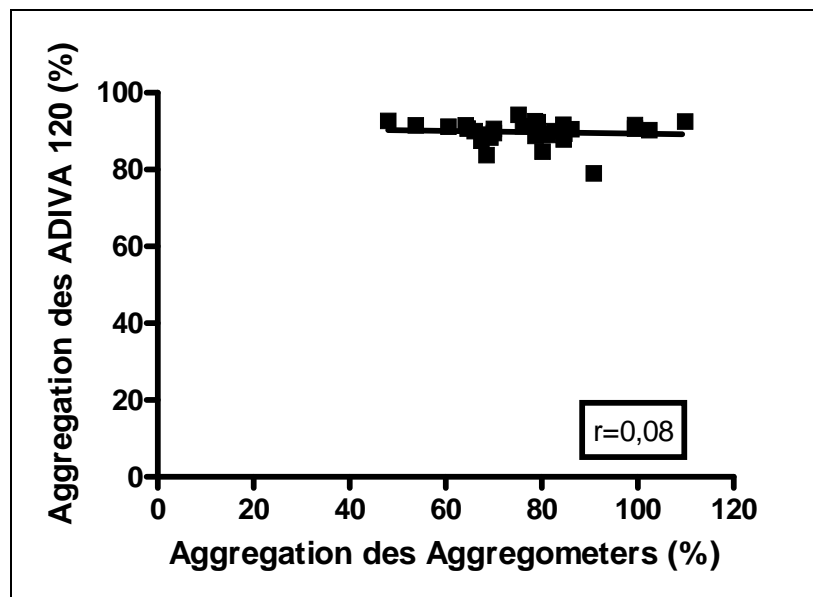


Abbildung 17: Korrelation der mittels APACT 4™ Aggregometer und ADVIA 120™ gemessenen prozentualen Aggregation (n=31 Hunde, 1. Teil der Studie)

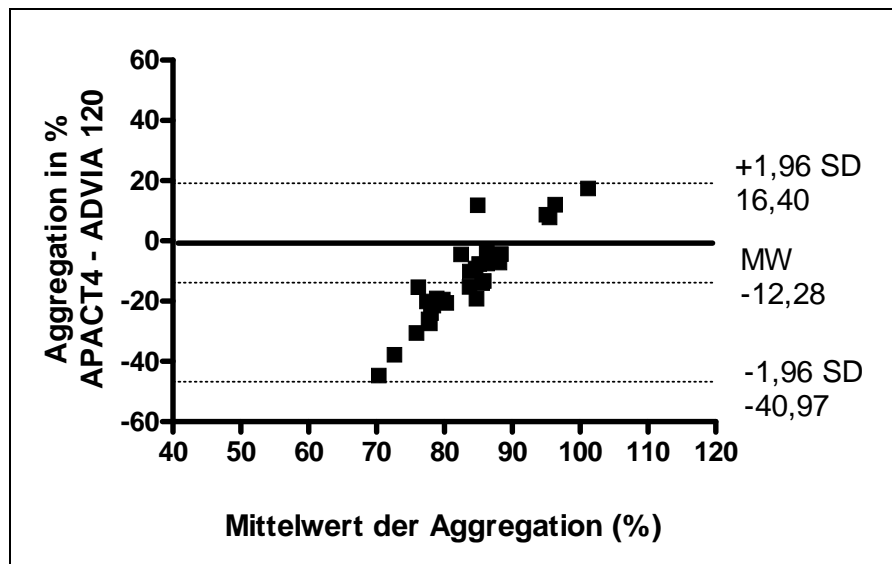


Abbildung 18: Bland-Altman Diagramm zum Vergleich der Messergebnisse des Aggregometers ATRACT 4™ Aggregometer und des ADVIA 120™ (n= 31 Hunde, 1. Teil der Studie).

Dargestellt wird die prozentuale Abweichung der Differenz der beiden Methoden vom Mittelwert beider Messverfahren. Die oberste bzw. unterste gestrichelte Linie geben jeweils die positive und negative 1,96fache Standardabweichung an. Die mittlere gestrichelte Linie zeigt den durchschnittlichen Mittelwertsunterschied (Bias).

Abkürzungen: MW= Mittelwertunterschied beider Methoden; SD= Standardabweichung des Mittelwertunterschieds

Die lineare Regressionsanalyse ergab einen Korrelationskoeffizienten von $r=0,08$ (Abbildung 17) und somit keine Korrelation zwischen den mit beiden Geräten erzielten Messwerten. Durchschnittlich lagen die mit dem ADVIA 120™ erzielten Ergebnisse höher als die Resultate des ATRACT4™ Aggregometers, was einem durchschnittlichen Mittelwertsunterschied (Bias=systematischer Fehler) von -12,28% entspricht (Abbildung 18). Auffällig ist jedoch eine große Standardabweichung insbesondere in den negativen Bereich (Abbildung 18). und ein deutlicher proportionaler Fehler zwischen den Messergebnissen: So ist in den niedrigeren Messbereichen (Aggregationswerte zwischen 70 und 90%) die mit dem ADVIA 120™ ermittelten Resultate höher als die Messergebnisse des ATRACT 4™ Aggregometers, wogegen dies im hohen Messbereich (Aggregationswerte zwischen 95 und 100%) umgekehrt ist.

4.1.4.2. Vergleich der prozentualen Aggregation nach Messung mit dem ATRACT 4™ Aggregometer und dem VetABC™

In den folgenden Abbildungen ist die Korrelation zwischen den mit dem ATRACT 4™ und dem VetABC™ ermittelten Aggregationswerten und die Abweichung der Differenz vom Mittelwert dargestellt.

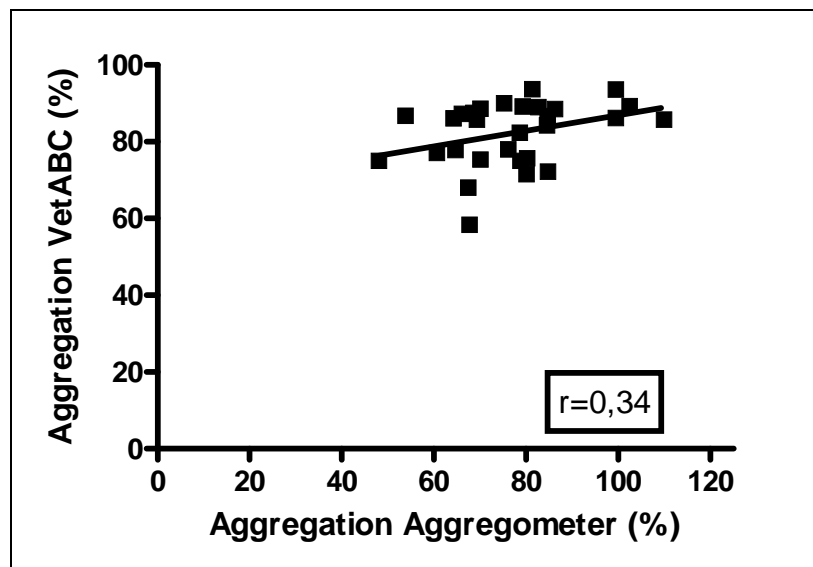


Abbildung 19: Lineare Regressionsanalyse der mit dem ATRACT 4™ Aggregometer und VetABC™ ermittelten prozentualen Aggregation (n=31 Hunde, 1. Teil der Studie)

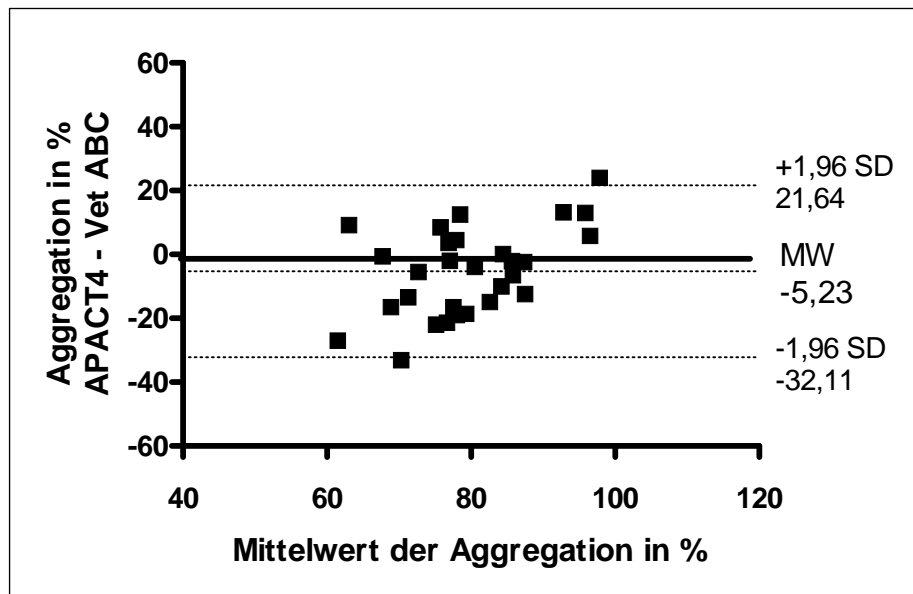


Abbildung 20: Bland-Altman Diagramm zur Darstellung der Ergebnisse der Aggregation des APACT 4™ Aggregometer und des VetABC™ (n= 31 Hunde, 1. Teil der Studie)

Abkürzungen: MW= Mittelwertunterschied beider Methoden; SD= Standardabweichung des Mittelwertunterschieds

Die lineare Regressionsanalyse ergab mit einem Korrelationskoeffizienten von $r=0,34$ eine schlechte Korrelation zwischen beiden Geräten (Abbildung 19)

Im Bland-Altman-Diagramm war ein geringer durchschnittlicher Mittelwertsunterschied der Aggregation (Bias) von -5,23 % mit einer großen positiven und negativen Standardabweichung sichtbar (Abbildung 20). Analog zu dem Vergleich zwischen APACT 4™ Aggregometer und ADIVA 120™ ist auch hier ein deutlicher proportionaler Fehler erkennbar. So sind die mit dem APACT 4™ gemessenen Aggregationswerte in Messbereichen unter 90% der Aggregation niedriger und über 90% höher als die des VetABC™.

4.1.4.3. Vergleich der prozentualen Aggregation nach Messung mit dem ADVIA 120™ und dem VetABC™

Nachfolgend werden die Daten des ADVIA 120™ und des VetABC™ mittels linearer Regressionsanalyse und als Abweichung der Differenz vom Mittelwert verglichen.

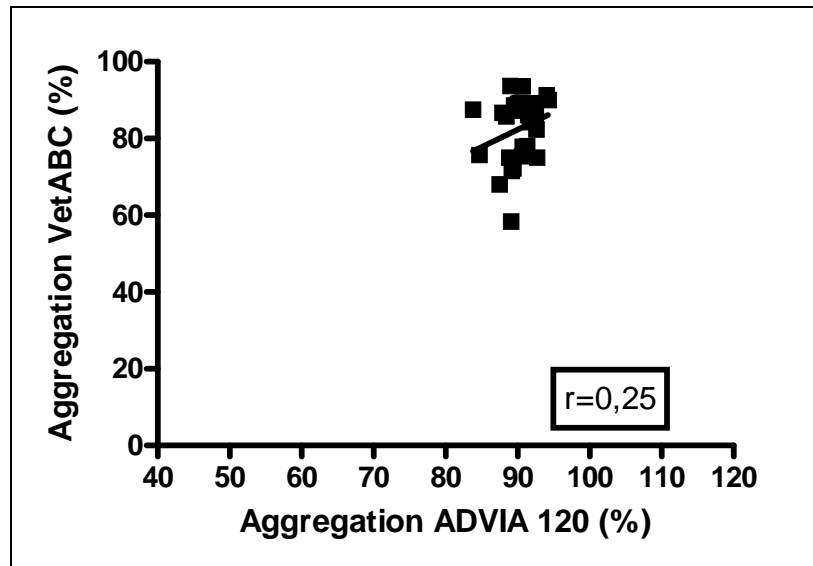


Abbildung 21: Lineare Regressionsanalyse der mittels VetABC™ und ADVIA 120™ ermittelten prozentualen Aggregation (n=31 Hunde, 1. Teil der Studie)

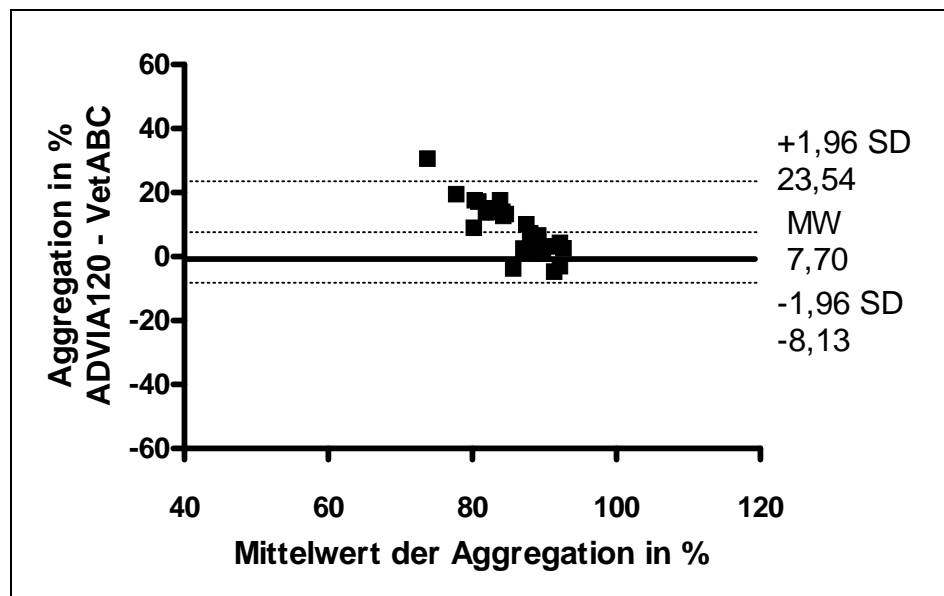


Abbildung 22: Ergebnisse des ADVIA 120™ und des VetABC™ als Bland-Altman-Diagramm aufgezeichnet (n= 31 gesunde Hunde, 1. Teil der Studie).

Abkürzungen: MW= Mittelwertunterschied beider Methoden; SD= Standardabweichung des Mittelwertunterschieds

Die lineare Regression der prozentualen Aggregation zeigt mit einem Korrelationskoeffizienten von $r=0,25$ - ebenso wie bei den vorherigen Gerätevergleichen - eine schlechte Korrelation zwischen den Messergebnissen beider Geräte (Abbildung 21).

Im Bland-Altman Diagramm zeigt sich, dass mit dem ADVIA 120™ fast ausschließlich höhere Aggregationswerte als mit dem VetABC™ ermittelt wurden. Diese Abweichung ist insbesondere im niedrigen Messbereich (Aggregationswerte 70-85%) deutlich, so dass auch hier ein proportionaler Fehler und daraus resultierend eine große Streubreite der Ergebnisse vorliegt.

4.1.5. Thrombozytenparameter

Im Folgenden werden die im Literaturteil angegebenen Thrombozytenparameter vor und nach Aktivierung mit Kollagen dargestellt. Aufgeführt werden die Messergebnisse der zu untersuchenden Probe (im folgenden „Probe“ genannt), der Kontrolle, einer mit 100 µl NaCl versetzten Citratprobe (nachfolgend „Kontrolle“ genannt), und einer Citratprobe ohne Zusatz von Induktor oder NaCl (nachfolgend „Citrat“ genannt, siehe auch Abbildung 14) zum Zeitpunkt 8 Minuten.

4.1.5.1. Mittleres Thrombozytenvolumen – MPV

In der kommenden Abbildung wird die Veränderung des MPV 8 Minuten nach Aktivierung mit Kollagen im Vergleich zu den Kontrollproben „Kontrolle“ und „Citrat“ graphisch dargestellt.

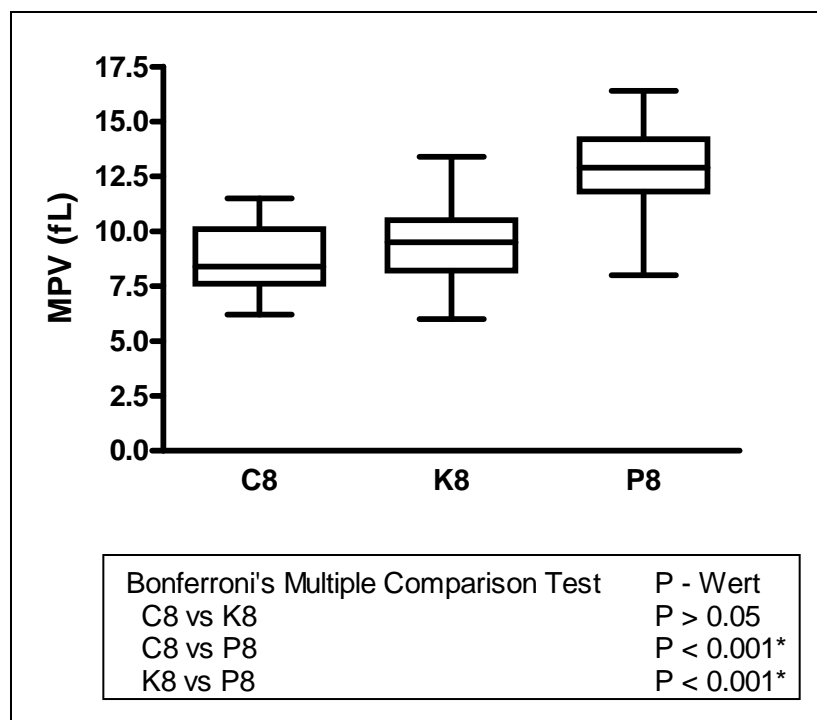


Abbildung 23: Darstellung des mittleren Thrombozytenvolumens (MPV) zwischen den einzelnen Proben zum Zeitpunkt 8 Minuten inklusive Bonferroni's Multiple Comparison Test

Der Box and Whisker Plot stellt 50% der beobachteten Daten dar und wird begrenzt durch die beiden Quartile, innerhalb der Box wird der Median angegeben. Die unteren und oberen „Whiskers“ geben die minimalen und maximalen Werte an.

Abkürzungen: C8 = Citratprobe (Citrat); K8 = Kontrolle und P8 = Probe jeweils zum Zeitpunkt 8 Minuten.

Abkürzung: * = signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den anderen Proben ($P < 0.001$)

Tabelle 4 :Mittelwerte und Standardabweichungen des MPV von Citrat, Kontrolle und Probe zum Zeitpunkt 8 Minuten

MPV (fL)	Citrat 8	Kontrolle 8	Probe 8
Mittelwert	8,60	9,42	12,82 *
SD	1,25	1,65	1,86

Abkürzung: * = signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den anderen Proben ($P < 0.001$)

Wie in Abbildung 23 und Tabelle 4 ersichtlich ist, resultierte die Zugabe von Kollagen in einem signifikanten Anstieg des MPV im Vergleich zu den Kontrollproben Kontrolle und Citrat.

4.1.5.2. Mittlere Konzentration innerer Thrombozytenbestandteile – MPC

In der nachstehenden Abbildung und Tabelle wird der Einfluss des Aggregationsinduktors Kollagen auf den MPC als Maß für den Aktivierungsgrad (Degranulation) der Thrombozyten gezeigt.

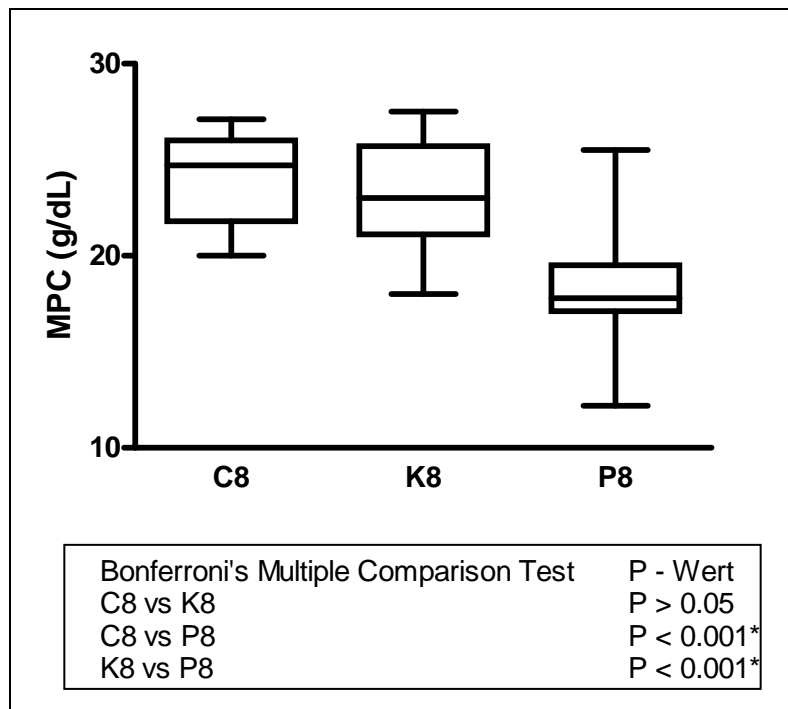


Abbildung 24: Box and Whisker Plots der Mittleren Konzentration innerer Thrombozytenbestandteile (MPC) der Proben zum Zeitpunkt 8 Minuten inklusive Bonferroni's Multiple Comparison Test

Abkürzungen: C8 = Citrat, K8 = Kontrolle und P8 = Probe jeweils zum Zeitpunkt 8 Minuten.

Abkürzung: * = signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den anderen Proben ($P < 0.001$)

Tabelle 5: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des MPC von Citrat, Kontrolle und Probe zum Zeitpunkt 8 Minuten nach Induktorzugabe

	Citrat 8	Kontrolle 8	Probe 8
Mittelwert	24,07g/dl	23,12g/dl	18,31g/dl*
SD	2,23	2,58	2,37

Abkürzung: * = signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den anderen Proben (P<0.001)

In der Abbildung 24 und Tabelle 5 wird deutlich, dass die Zugabe von Kollagen zu der Probe im Vergleich zu den beiden Kontrollproben Kontrolle und Citrat zu einem signifikanten Absinken des MPC – und somit zu einer Thrombozytenaktivierung – geführt hat.

4.1.5.3. Verteilungsbreite der mittleren Konzentration innerer Thrombozytenbestandteile – PCDW

Nachfolgend erfolgt die Darstellung der Auswirkungen einer Induktorzugabe auf den PCDW, d.h. die Verteilungsbreite des mittleren internen Thrombozytenanteils, der die Verteilung von Thrombozyten des gleiches Aktivierungsgrades angibt.

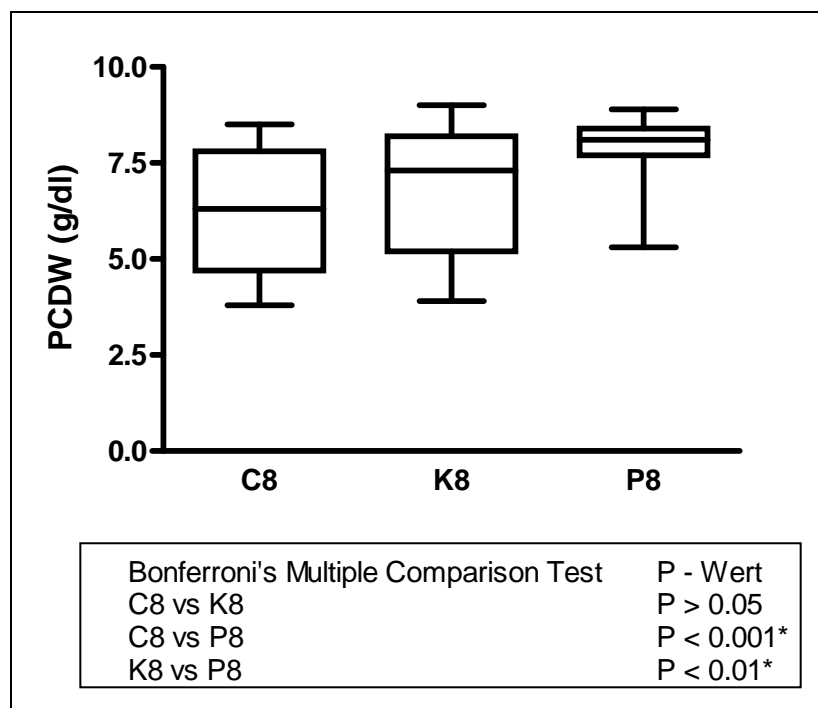


Abbildung 25: Box and Whisker Diagramm der Verteilungsbreite der mittleren Konzentration innerer Thrombozytenbestandteile – PCDW der Proben zum Zeitpunkt 8 Minuten inklusive Bonferroni's Multiple Comparison Test

Abkürzungen: C8 = Citratprobe (Citrat); K8 = Kontrolle und P8 = Probe jeweils zum Zeitpunkt 8 Minuten.

Abkürzung: * = signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den anderen Proben ($P < 0.001$: Vergleich C8 und P8 und $P < 0,01$: Vergleich K8 / P8)

Tabelle 6 : Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des PCDW von Citrat, Kontrolle und Probe zum Zeitpunkt 8 Minuten

	Citrat 8	Kontrolle 8	Probe 8
Mittelwert	6,28g/dl	6,80g/dl	7,93g/dl*
SD	1,58	1,64	0,75

Abkürzung: * = signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den anderen Proben (P<0.001: Vergleich C8 und P8 und P<0,01: Vergleich K8 / P8)

Abkürzungen: C8 = Citratprobe (Citrat); K8 = Kontrolle und P8 = Probe jeweils zum Zeitpunkt 8 Minuten.

Die Induktion der Aggregation mit Kollagen resultierte in einem signifikanten Anstieg des PCDW im Vergleich zu den Kontrollproben (Abbildung 25 und Tabelle 6). Insgesamt fällt auf, dass die Varianz der Messwerte bei der Probe deutlich geringer als in den Kontrollproben ist (Abbildung 25).

4.1.5.4. Große Thrombozyten – large PLT

In den nachstehenden Abbildungen und Tabellen wird die Anzahl der großen Thrombozyten vor und nach Aktivierung mit Kollagen und ihr relativer Anteil an der Gesamtthrombozytenzahl in der Probe gezeigt.

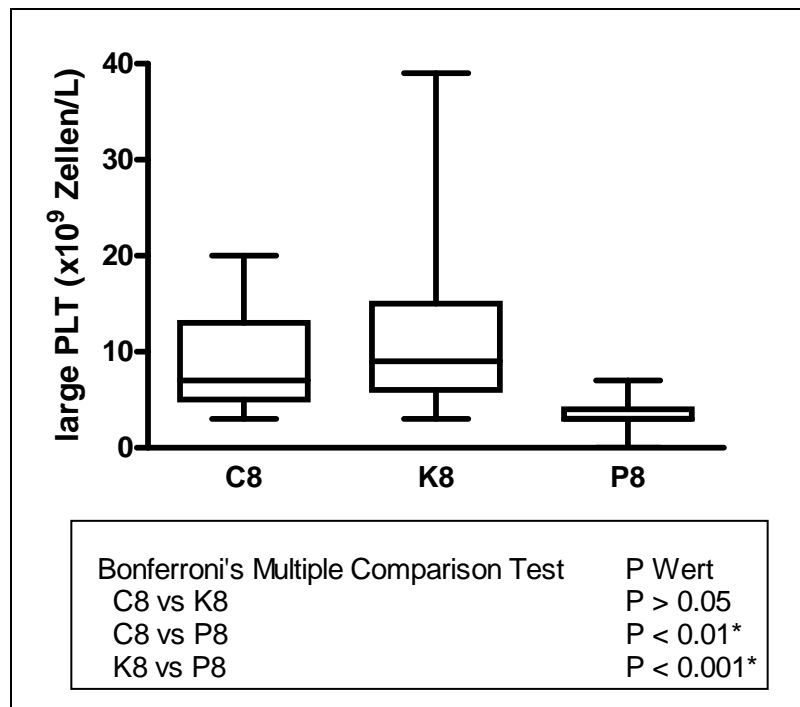


Abbildung 26: Darstellung der Anzahl der large platelets in den einzelnen Proben zum Zeitpunkt 8 Minuten inklusive Bonferroni's Multiple Comparison Test

Abkürzungen: C8 = Citrat, K8 = Kontrolle und P8 = Probe jeweils zum Zeitpunkt 8 Minuten.

Abkürzung: * = signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den anderen Proben (P<0.01: Vergleich C8 und P8 und P<0,001: Vergleich K8 / P8)

Tabelle 7: Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der großen Thrombozyten von Citrat, Kontrolle und Probe zum Zeitpunkt 8 Minuten

	Citrat 8	Kontrolle 8	Probe 8
Mittelwert	$8,91 \times 10^9/l$	$12,29 \times 10^9/l$	$3,23 \times 10^9/l$
SD	5,91	9,02	1,20

Abkürzung: * = signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den anderen Proben
($P < 0.01$: Vergleich C8 und P8 und $P < 0,001$: Vergleich K8 / P8)

Die Induktion der Aggregation führte zu einem signifikanten Absinken der Gesamtzahl großer Thrombozyten (Abbildung 26 und Tabelle 7) im Vergleich zu den Kontrollproben. In der aggregierten Probe fällt eine deutlich geringe Streubreite der Resultate als in den Kontrollen (Citrat, Kontrolle) auf.

Prozentualer Anteil der großen Thrombozyten an der Gesamthrombozytenzahl

Um die Auswirkung der Thrombozytenaggregation auf die großen Thrombozyten besser vergleichen zu können, wurden diese ins Verhältnis zur Gesamthrombozytenzahl der Probe gesetzt.

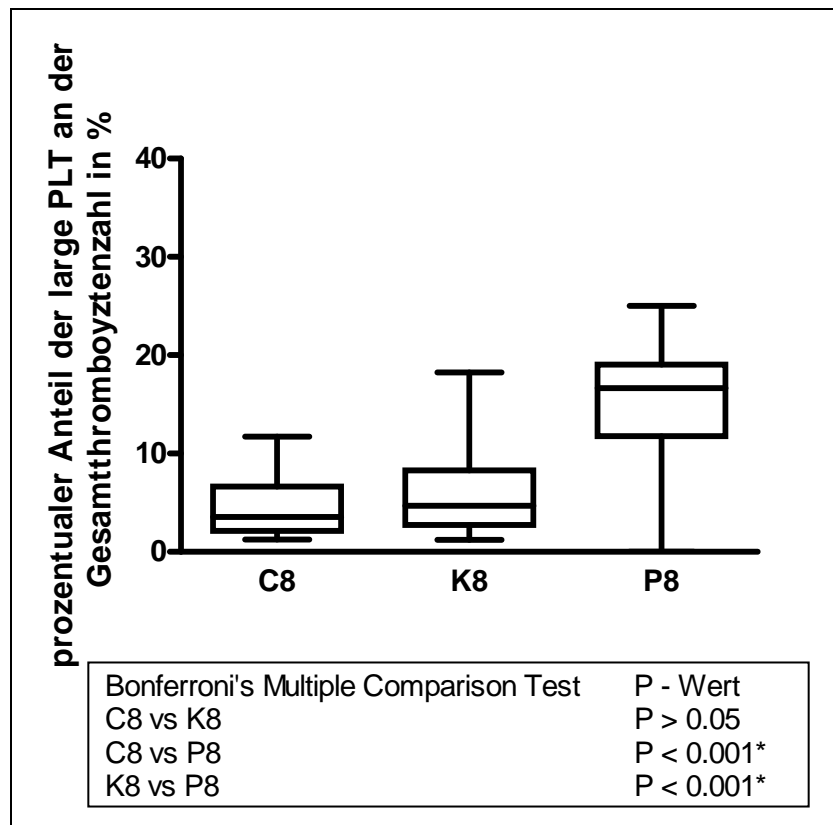


Abbildung 27: Prozentualer Anteil der large platelets an der Gesamthrombozytenzahl der einzelnen Proben zum Zeitpunkt 8 Minuten inklusive Bonferroni's Multiple Comparison Test

Abkürzungen: C8 = Citratprobe (Citrat); K8 = Kontrolle und P8 = Probe jeweils zum Zeitpunkt 8 Minuten.

Abkürzung: * = signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den anderen Proben ($P < 0.001$)

Tabelle 8 : Mittelwerte und Standardabweichungen des prozentualen Anteils der großen Thrombozyten an der Gesamtthrombozytenzahl von Citrat, Kontrolle und Probe zum Zeitpunkt 8 Minuten

	Citrat 8	Kontrolle 8	Probe 8
Mittelwert	4,21%	5,87%	15,58%*
SD	2,54	4,37	5,07

Abkürzung: * = signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den anderen Proben (P<0.001)

Wie in Abbildung 27 und Tabelle 8 ersichtlich, kommt es durch Induktion der Aggregation zu einem signifikanten Anstieg der relativen Anteils großer Thrombozyten an der Gesamtthrombozytenzahl im Vergleich zu den beiden Kontrollproben. Es ist ebenfalls ein geringgradiger Anstieg des relativen Anteils großer Thrombozyten nach Zugabe von NaCl nachweisbar (Kontrolle), jedoch ist dieser statistisch nicht signifikant.

4.1.5.5. Thrombozytenverteilungsbreite – PDW

In der nachfolgenden Abbildung wird die Änderung des PDW durch die Aktivierung der Thrombozyten gezeigt.

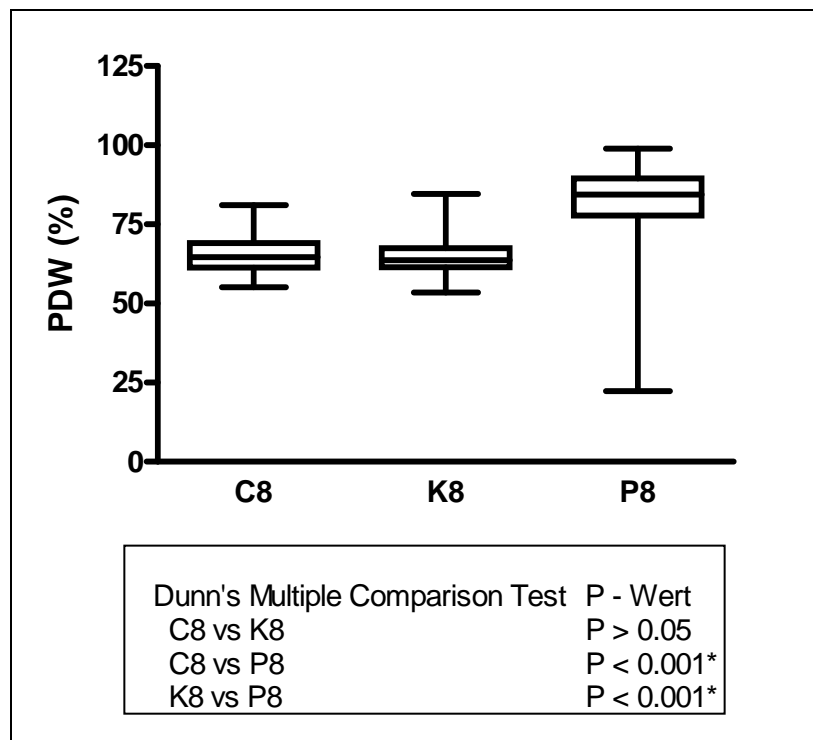


Abbildung 28: Thrombozytenverteilungsbreite in den einzelnen Proben zum Zeitpunkt 8 Minuten inklusive Dunn´s Multiple Comparison Test

Abkürzungen: C8 = Citrat, K8 = Kontrolle und P8 = Probe jeweils zum Zeitpunkt 8 Minuten.

Abkürzung: * = signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den anderen Proben (P<0.001)

Tabelle 9 : Median und range des PDW von Citrat, Kontrolle und Probe zum Zeitpunkt 8 Minuten

	Citrat 8	Kontrolle 8	Probe 8
Median	64,60%	63,70%	84,40%*
range	55,20-81,10	53,50-84,60	22,30-98,90

Abkürzung: * = signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den anderen Proben (P<0.001)

Ebenso wie der relative Anteil großer Thrombozyten nimmt auch die Thrombozyten-Verteilungsbreite (PDW) nach Induktion der Aggregation im Vergleich zu den Kontrollproben signifikant zu (Abbildung 28, Tabelle 9).

4.1.5.6. Thrombozytenaggregate - Clumps

Weiterhin von Interesse war die Fragestellung, ob die Thrombozytenaggregation zu einer Veränderung der vom ADVIA 120™ gemessenen Thrombozytenaggregate (Clumps) führt, die nachfolgend dargestellt sind.

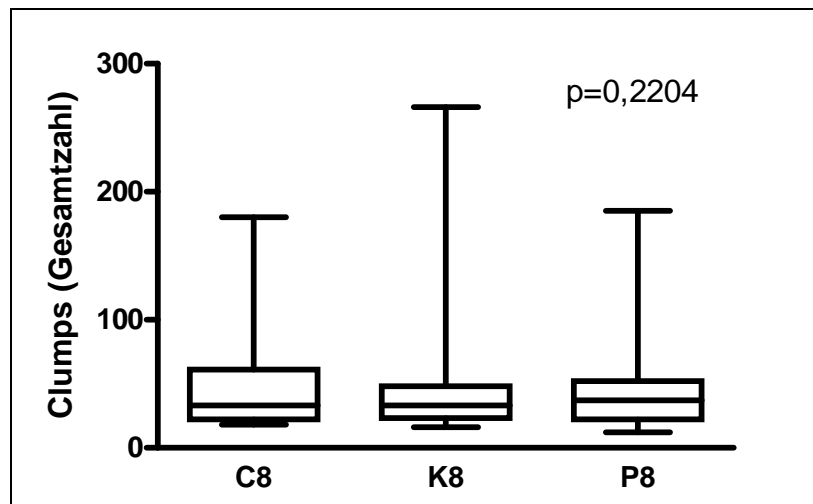


Abbildung 29: Darstellung der Clumps in den einzelnen Proben zum Zeitpunkt 8 Minuten

Abkürzungen: C8 = Citratprobe (Citrat); K8 = Kontrolle und P8 = Probe jeweils zum Zeitpunkt 8 Minuten.

Tabelle 10: Darstellung des Median und des range der Clumps von Citrat, Kontrolle und Probe zum Zeitpunkt 8 Minuten

	Citrat 8	Kontrolle 8	Probe 8
Median	33 Clumps	33 Clumps	37 Clumps
range	18-180	16-266	12-185

Wie aus Abbildung 29 und Tabelle 10 ersichtlich ist, kam es nach Induktion der Aggregation überraschenderweise zu keiner signifikanten Veränderung der vom ADVIA 120™ detektierten Thrombozytenaggregate (Clumps).

4.1.5.7. Große peroxidasenegative Zellen – LUC

Bei der Auswertung der Perox-Scattergramme des ADVIA 120™ zeigte nach Induktion der Aggregation mit Kollagen überraschenderweise eine Zunahme von großen peroxidasenegativen Zellen (LUCs), die jedoch nicht in den Kontrollproben sichtbar war

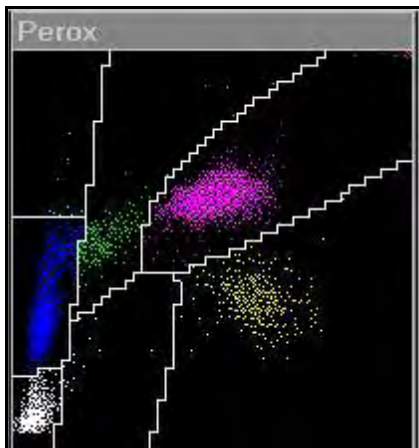


Abbildung 30a: ADVIA 120™
Perox-Scattergramm vor Zugabe
des Kollagens.
Es sind nur ganz vereinzelte
Zellen im Cluster großer
peroxidasenegativer Zellen
(LUCs) sichtbar (hellblaue
Zellpopulation)

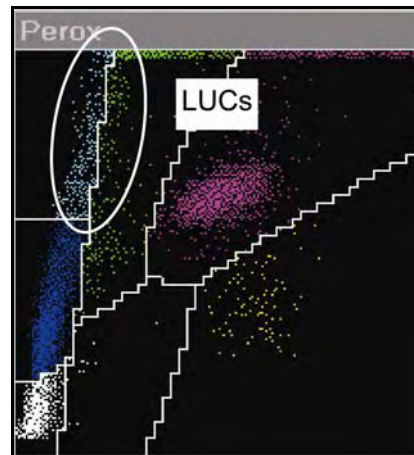


Abbildung 30b: ADVIA 120™
Perox- Scattergramm nach
Zugabe des Kollagens.
Die Markierung zeigt die Zunahme
der LUCs als hellblaue
Zellpopulation, die schräg in das
Monozytencluster hinüberzieht
(grüne Zellpopulation).

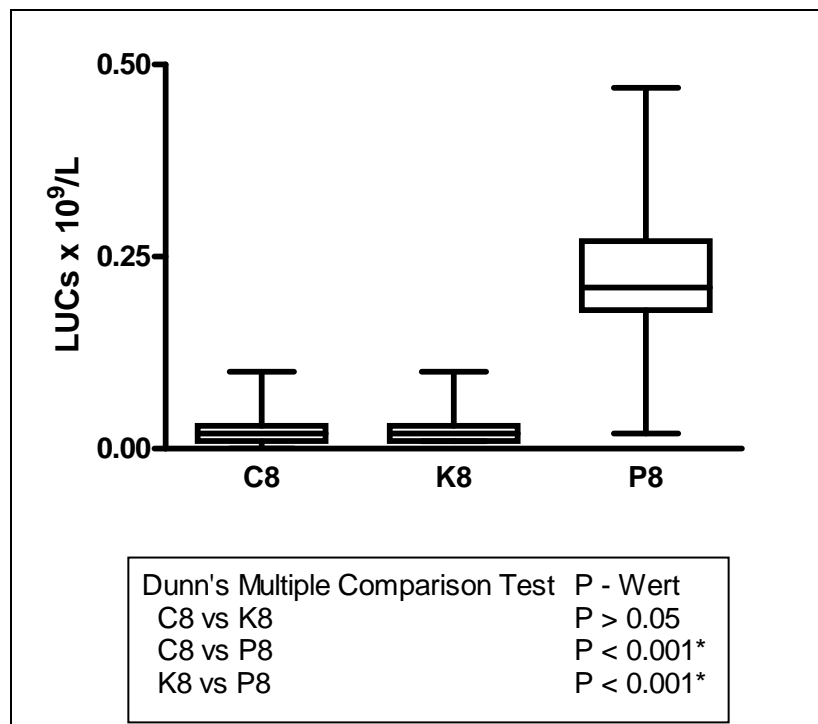


Abbildung 31: Veränderung der großen peroxidasenegativen Zellen der Proben zum Zeitpunkt 8 Minuten inklusive Dunn's Multiple Comparison Test

Abkürzungen: C8 = Citrat, K8 = Kontrolle und P8 = Probe jeweils zum Zeitpunkt 8 Minuten.

Abkürzung: * = signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den anderen Proben (P<0.001)

Tabelle 11: Median und range der LUCs von Citrat, Kontrolle und Probe zum Zeitpunkt 8 Minuten

	Citrat 8	Kontrolle 8	Probe 8
Median	0,02 LUC x 10 ⁹ /l	0,02 LUC x 10 ⁹ /l	0,21 LUC x 10 ⁹ /l*
range	0,0-0,1	0,01-0,1	0,02-0,47

Abkürzung: * = signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den anderen Proben (P<0.001)

Wie in Abbildung 31 und Tabelle 11 dargestellt, war der Anstieg der LUCs nach der Thrombozytenaggregation hochsignifikant, allerdings zeigt sich eine große Varianz der Ergebnisse.

Weiterhin wurden die Blutausstriche der Probanden der Gruppe 1 zum Zeitpunkt 8 nach Aggregation („Probe 8“) untersucht. Als LUCs konnten große Thrombozyten – Leukozytenaggregate identifiziert werden. Leukozyten, die Bestandteil der Aggregate waren, zeigte eine Aktivierung in Form von Vakuolenbildung. Andere Veränderungen, die zum Ansteigen der LUCs hätten führen können, fanden sich nicht. Zudem konnten kleinste Thrombozytenaggregate von 2-4 Thrombozyten und mittelgroße Thrombozytenaggregate gefunden werden.

4.1.5.8. Tabellarische Übersicht über die Auswirkung der Aggregation auf die Thrombozytenparameter des ADVIA 120™

In der folgenden Tabelle sollen die Veränderungen der Thrombozytenparameter des ADVIA 120™ übersichtlich dargestellt werden.

Parameter	Abkürzung	Auswirkung
Mittleres Thrombozytenvolumen	MPV	↑
Mittlerer interner Thrombozytenbestandteil	MPC	↓
Verteilungsbreite des MPC	PCDW	↑
Große Thrombozyten	Large PLT	↓
Prozentualer Anteil großer Thrombozyten an der Gesamtthrombozytenzahl		↑
Thrombozytenverteilungsbreite	PDW	↑
Thrombozytenaggregate	Clumps	n.s.
Große peroxidasenegative Zellen	LUC	↑

Abbildung: 32: Tabellarische Übersicht über die statistisch signifikanten Veränderungen der Thrombozytenparameter des ADVIA 120™ vor und 8 Minuten nach erfolgte Aggregation

Abkürzungen:

↑ = statistisch signifikanter Anstieg

↓ = statistisch signifikanter Abfall

n.s. = statistisch nicht signifikante Veränderung

4.2. Ergebnisse der simulierten Anämie im Vergleich mit einer unbearbeiteten Kontrolle (Gruppe 2)

Im 2. Teil dieser Arbeit sollten die Auswirkungen einer simulierten Anämie (Hkt: 0,15 – 0,19 l/l) auf die Thrombozytenaggregation von 6 gesunden Hunden evaluiert werden. Ausgewertet wurden die mit den beiden Hämatologiegeräten ADVIA 120™ und VetABC™ ermittelten Ergebnisse der anämischen Probe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Die Proben der *in vitro* – Untersuchungen stammen von Hunden unterschiedlicher Rassen (zwei Mischlinge, zwei Beagle, ein Deutscher Schäferhund und ein Weimaraner) im Alter zwischen 1 und 13 Jahren. Vier der Tiere waren männlichen und zwei weiblichen Geschlechtes.

4.2.1. Vergleich der Thrombozytenaggregation zwischen Kontrolle und anämischer Probe nach Messung am ADVIA 120™

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse von sechs Proben mit Kontrolle und einer Anämie am ADVIA 120™.

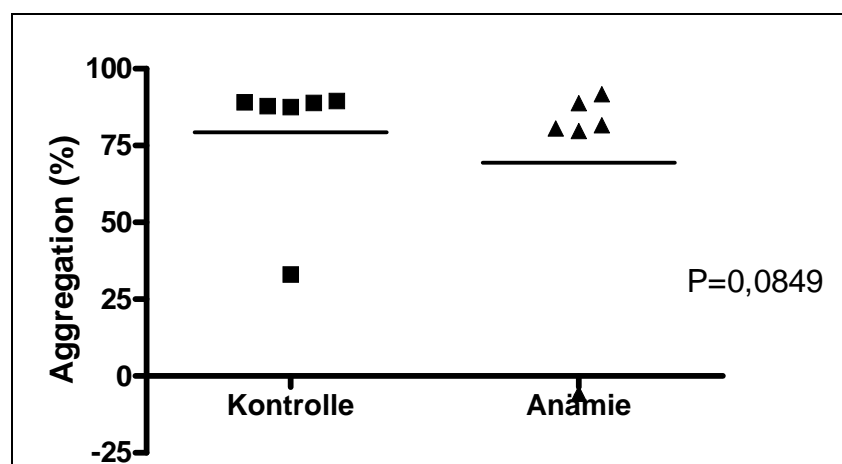


Abbildung 33: Scatter Plot Darstellung der Einzelwerte der prozentualen Aggregation der unveränderten und der anämischen Proben am ADVIA 120™ im Vergleich (n= 6)

Tabelle 12. : Mittelwert und Standardabweichung (SD) der Thrombozytenaggregation von Kontrolle und Probe (Anämie) nach Messung am ADVIA 120™

Aggregation (%)	Kontrolle	Anämie
Mittelwert	79,3	73,1
SD	22,6	28,1

Wie aus Abbildung 33 und Tabelle 12 ersichtlich, hatte eine Anämie keinen Einfluss auf die mittels ADVIA 120™ bestimmte Vollblut-Thrombozytenaggregation. Die Werte, welche bei Probe und Kontrolle am weitesten abweichen, stammten vom gleichen Patienten (Abbildung 33). Aufgrund der niedrigen Aggregation bei Patient 6 (niedrigste Aggregationswerte in Abbildung 33) wurden nach 9 und nach 10 Minuten nochmals Aggregationswerte berechnet. Es ergab sich eine prozentuale Aggregation von 72,4 bzw. 86,9%.

4.2.2. Vergleich der Thrombozytenaggregation von Kontrolle und anämischer Probe nach Messung am VetABC™

Die folgende Abbildung zeigt die Messergebnisse von sechs Proben der Kontrolle und der *in vitro* hergestellten Anämie am VetABC™

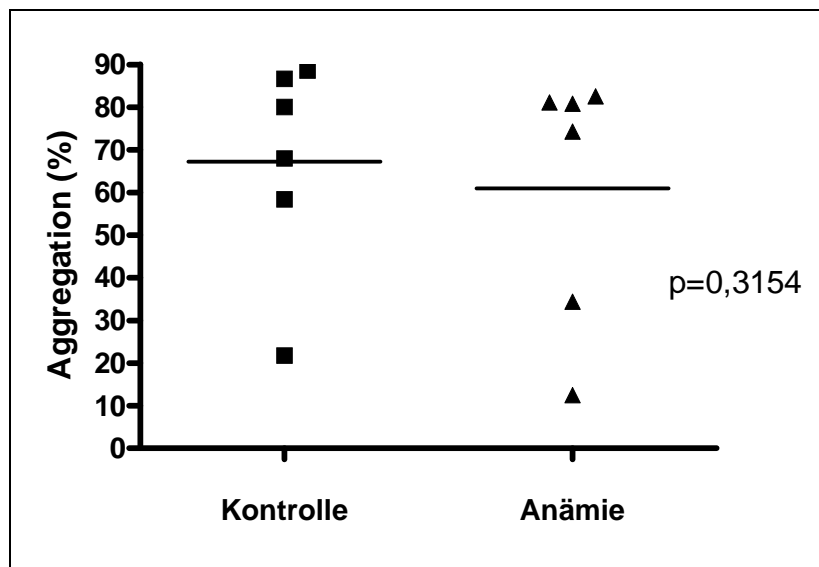


Abbildung 34: VetABC™-Resultate der prozentualen Aggregation der unveränderten und der anämischen Probe (n= 6)

Tabelle 13: Mittlere Aggregation und Standardabweichung von unveränderter und anämischer Probe nach Messung am VetABC™

	unverändert	Anämie
Mittelwert	67,3%	57,9%
SD	25,1	36,2

Analog zu den Messungen am ADVIA 120™ hatte eine Anämie keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Messungen am VetABC™ (Abbildung 34 und Tabelle 13). Wie auch beim ADVIA 120™ stammen die am weitesten abweichenden Proben von Anämie und Kontrolle vom gleichen Patienten.

Aufgrund der niedrigen Aggregation bei Patient 6 (niedrigste Aggregationswerte in Abbildung 34) wurden nach 9 und nach 10 Minuten nochmals Aggregationwerte berechnet. Es ergab sich eine prozentuale Aggregation von 59,3 bzw. 78,3%.

4.2.1. Vergleich der Aggregation des ADVIA 120™ und des VetABC™ zwischen Kontrolle und Anämie

Weiterhin war von Interesse, ob sich die Messwertunterschiede zwischen den beiden Hämatologiegeräten in pathologisch veränderten Proben wie z.B. beim Vorhandensein einer Anämie von denen einer unveränderten Probe unterscheiden. Nachfolgend sind die Ergebnisse der Differenz zwischen ADVIA 120™- und VetABC™ Messwerten jeweils von der Kontrolle und der anämischen Probe dargestellt.

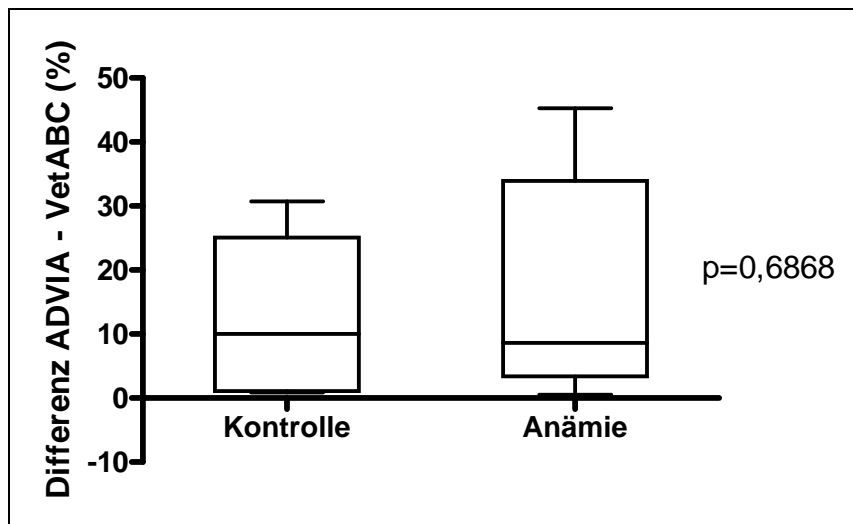


Abbildung 35: Box and Whisker blot – Darstellung der Differenz der prozentualen Aggregation zwischen ADVIA 120™ und VetABC™ der unveränderten und der anämischen Proben.

Das Vorhandensein einer Anämie hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Messwertunterschiede zwischen beiden Hämatologiesystemen, allerdings fällt eine größere Varianz der Differenzen in den anämischen Proben auf (Abbildung 35).

4.3. Ergebnisse der Proben unter Einfluss von Heparin (Gruppe 3)

Das Ziel des dritten Teils dieser Arbeit war die Feststellung eines möglichen Einflusses von Heparin in verschiedenen Konzentrationen auf die Thrombozytenaggregation, dessen Ergebnisse nachfolgend beschrieben werden.

4.3.1. Vergleich der verschiedenen Heparinkonzentrationen zu einer Kontrolle

In den kommenden Abbildungen und Tabellen werden die Ergebnisse von drei verschiedenen Heparinkonzentrationen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle dargestellt.

Für Patient 3 konnte kein Ausgangswert für den ADVIA 120™ ermittelt werden (Messeinheit war durch die Probe verstopft). Daher wurde für die statistische Auswertung aus den Ergebnissen der restlichen fünf Probanden ein Mittelwert errechnet.

4.3.1.1. Vergleich des Einflussfaktors Heparinkonzentration zur Kontrolle nach Messung am APACT 4™ Aggregometer

Es erfolgte ein Vergleich der prozentualen Aggregation des Ausgangswertes mit den Aggregationswerten nach Zugabe von 0,1 IE, 1 IE und 10 IE Heparin pro ml Blut am APACT 4™ Aggregometer.

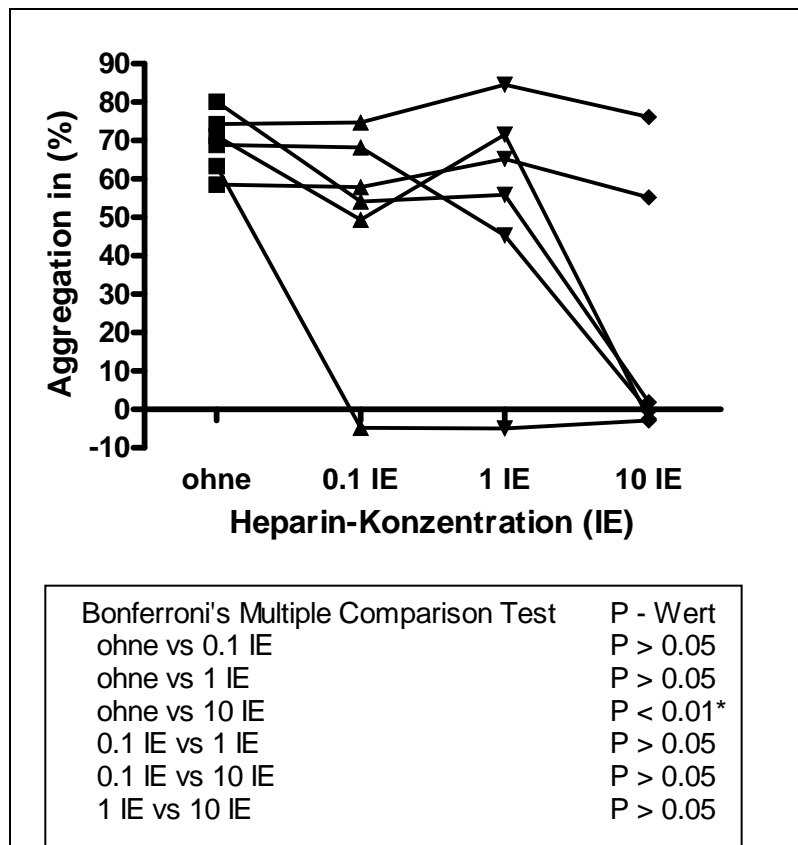


Abbildung 36: Einfluss verschiedener Heparinkonzentrationen auf die mit dem APACT4™ Aggregometer bestimmte prozentuale Aggregation (n= 6). Die Resultate der einzelnen Probanden sind mit einer Linie verbunden.

Abkürzung * = signifikanter Unterschied im Vergleich zum Ausgangswert (P < 0.01)

Tabelle 14: Mittelwerte und Standardabweichungen der Aggregation mit den unterschiedlichen Heparinkonzentrationen im Vergleich zum Ausgangswert

	Ohne Heparin	0,1 IE	1 IE	10 IE
Mittelwert	69,4%	49,9%	52,9%	21,2*
SD	7,71	28,37	31,35	35,08

Abkürzung * = signifikanter Unterschied im Vergleich zum Ausgangswert

Insgesamt ergab die statistische Analyse einen signifikanter Einfluss der Heparin-Konzentration auf die Aggregation ($P =$ von 0,0087). Im Bonferroni – post – Test waren jedoch lediglich Ausgangswert und die Aggregation mit einer Konzentration von 10 IE Heparin/ml Blut statistisch signifikant unterschiedlich ($P < 0,01$).

4.3.1.2. Einfluss der Heparinkonzentration auf die am ADVIA 120™ bestimmte Aggregation

In Abbildung 37 und Tabelle 15 ist die mittels ADVIA 120™ bestimmte prozentuale Aggregation nach Zugabe von 0,1 IE, 1 IE und 10 IE Heparin pro ml Blut im Vergleich zum Ausgangswert dargestellt.

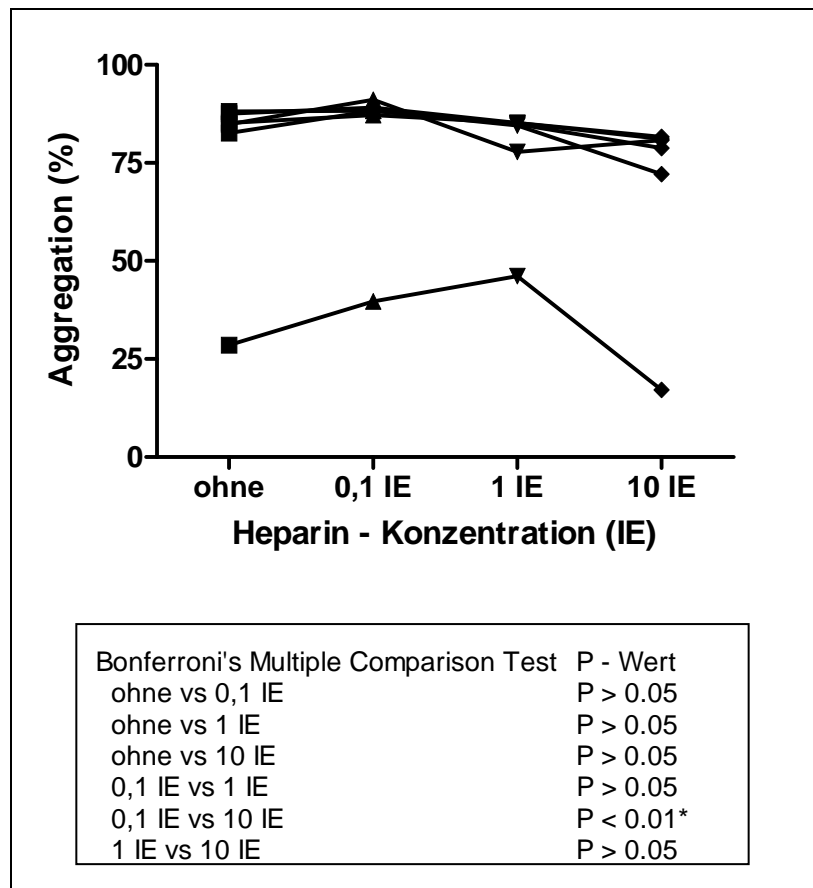


Abbildung 37: Einzelwerte der am ADVIA 120™ gemessenen prozentualen Aggregation unter dem Einfluss unterschiedlicher Heparinkonzentrationen (n= 6)

Die Resultate der einzelnen Probanden sind mit einer Linie verbunden.

Abkürzung * = signifikanter Unterschied im Vergleich zum Ausgangswert (P < 0.01)

Tabelle 15: Mittelwert und Standardabweichungen (SD) in den unterschiedlichen Heparinkonzentrationen im Vergleich zum Ausgangswert

Abkürzung *: statistische Signifikanz ($P < 0,01$) im Vergleich zur Konzentration 0,1 IE

	Ohne Heparin	0,1 IE	1 IE	10 IE
Mittelwert	76,1%	80,6%	77,3%	68,6%*
SD	23,4	20,1	15,5	25,5

Auch bei dieser Messmethodik zeigte sich insgesamt ein signifikanter Einfluss der Heparinkonzentration auf die Aggregation ($P=0,0062$). Dieser Gesamteffekt ist auf einen signifikanten Unterschied der Aggregation zwischen den Konzentrationen 0,1 IE/ml und 10 IE/ml Heparin zurückzuführen. Auffällig ist weiterhin, dass einer der Hunde (Hund Nr. 6) in allen untersuchten Proben eine deutlich niedrigere Aggregation als die anderen Probanden zeigte (Abbildung: 37).

4.3.1.3. Einfluss der Heparinkonzentration auf die am VetABC™ bestimmte Aggregation

Nachfolgend erfolgt ein Vergleich der prozentualen Aggregation des Ausgangswertes mit den ermittelten Werten nach Zugabe von 0,1 IE, 1 IE und 10 IE Heparin pro ml Blut am VetABC™.

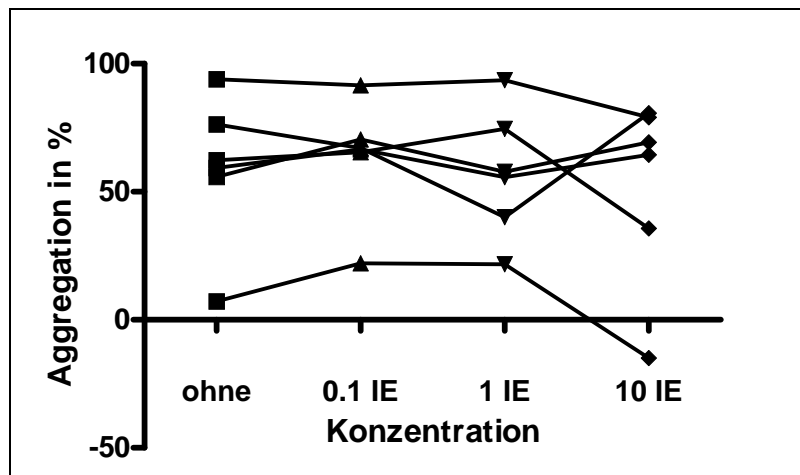


Abbildung 38: Illustration der prozentualen Aggregation des VetABC™ in unterschiedlichen Heparinkonzentrationen als Einzelwerte (n=6)

Die Resultate der einzelnen Probanden sind mit einer Linie verbunden.

Tabelle 16: Angabe der Mittelwerte und Standardabweichungen der Aggregation bei den unterschiedlichen Heparinkonzentrationen im Vergleich zum Ausgangswert

	Ohne Heparin	0,1 IE	1 IE	10 IE
Mittelwert	59,1%	63,8%	57,2%	52,4%
SD	29,1	22,7	25,2	36,7

Wie aus Abbildung 38 ersichtlich ist, war nach Bestimmung der Aggregation am VetABC eine größere individuelle Varianz der Resultate als bei der Messung am ADVIA 120™ feststellbar. Auch hier fällt Hund Nr. 6 auf, der deutlich niedrigere Resultate zeigt als die anderen Probanden. Insgesamt ergab die statistische Analyse im Gegensatz zu den anderen Messmethoden keinen signifikanten Einfluss der Heparinkonzentration auf die mittels VetABC™ bestimmte Aggregation ($P=0,5439$)

4.3.2. Methodenvergleich der einzelnen Geräte unter Einfluss von Heparin im Vergleich zur Kontrolle

Auch in diesem Teil der Studie sollte untersucht werden, ob Heparin den Unterschied zwischen den Messmethoden beeinflusst, was nachfolgend für die einzelnen Geräte dargestellt wird.

4.3.2.1. Vergleich der Differenzen zwischen den Resultaten des APACT 4™ Aggregometers und des ADVIA 120™ bei verschiedenen Heparinkonzentrationen

Insgesamt war ein signifikanter Einfluss der Heparinkonzentration auf die Differenzen zwischen den Ergebnissen beider Geräte nachweisbar. Dieser bestand allerdings nur zwischen dem Nullwert und 10 IE/ml Heparin ($P < 0,05$).

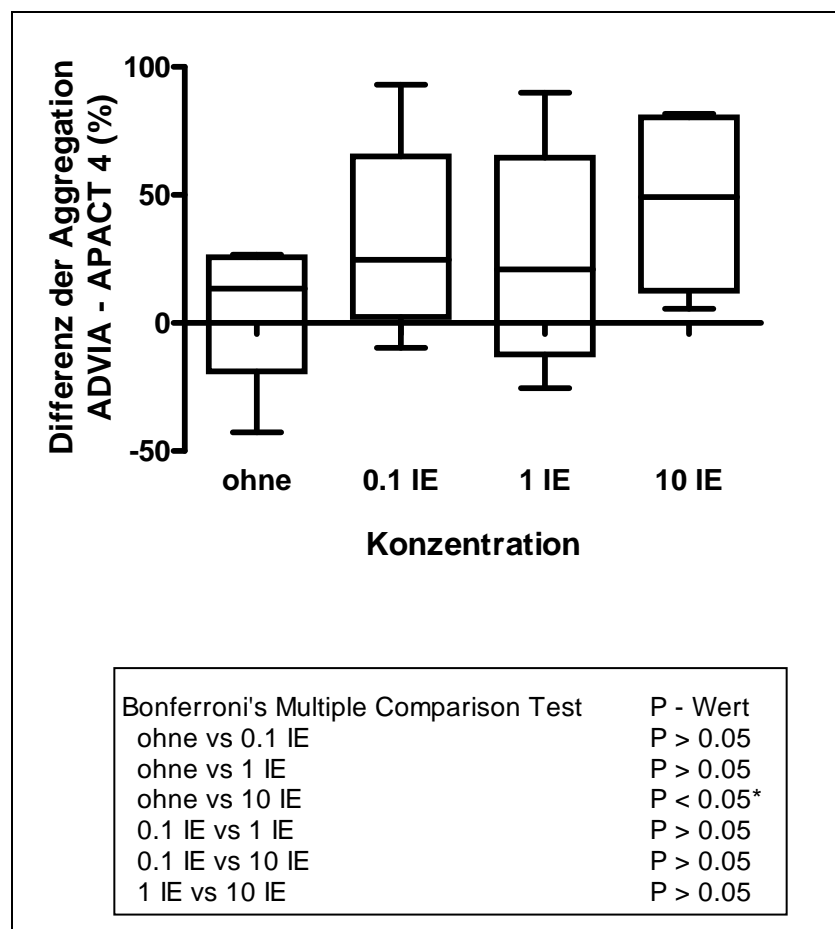


Abbildung 39: Differenz der Messresultate des APACT 4™ Aggregometer und des ADVIA 120™ bei unterschiedlichen Heparinkonzentrationen.

Abkürzung * = statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zum Ausgangswert ($P < 0,05$)

4.3.2.2. Vergleich der Differenzen zwischen den Resultaten des ATRACT 4™ Aggregometers und des VetABC™ bei verschiedenen Heparinkonzentrationen

Auch hier war mit einem p-Wert von 0,0288 ein statistisch signifikanter Einfluss von Heparin auf die Differenz der Messergebnisse zwischen beiden Geräten nachweisbar. Ähnlich wie bei den Auswertungen von ADVIA 120™ und ATRACT 4™ Aggregometer, ist dies auf einen signifikanten Unterschied zwischen den Messwertdifferenzen bei einer Konzentrationen von 10 IE/ml Heparin und dem Ausgangswert zurückzuführen ($P < 0,05$) festzustellen.

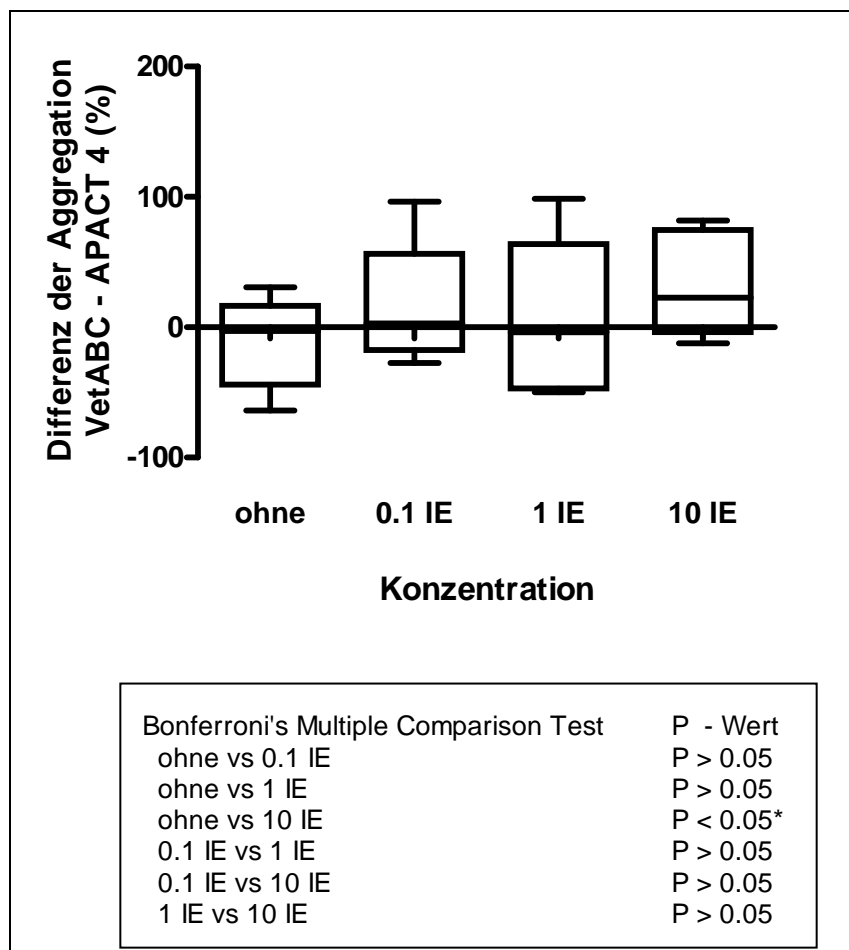


Abbildung 40: Differenz der Messwerte des ATRACT 4™ Aggregometer und des VetABC™ bei unterschiedlichen Heparinkonzentrationen.

Abkürzung * = statistisch signifikant mit einem P-Wert von $< 0,05$

4.3.2.3. Vergleich der Differenzen zwischen den Resultaten des ADVIA 120™ und des VetABC™ bei verschiedenen Heparinkonzentrationen

Im Gegensatz zu den vorherigen Vergleichen mit dem APACK 4™ Aggregometer ist kein signifikanter Einfluss der Heparinkonzentration auf die Messwertdifferenzen zwischen beiden Hämatologiegeräte ($P=0,9283$, Abbildung 41) nachweisbar.

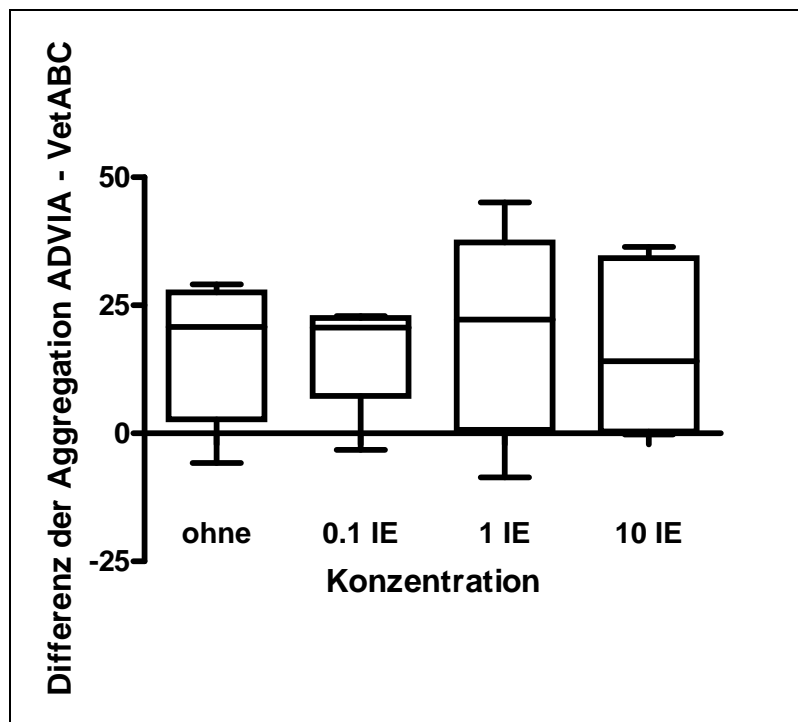


Abbildung 41: Messwertdifferenz von ADVIA 120™ und VetABC™ bei unterschiedlichen Heparinkonzentrationen..

4.3.3. Untersuchung der Einflussfaktoren Heparinkonzentration und Einwirkzeit auf die Thrombozytenaggregation

Im Rahmen dieser Untersuchung sollte herausgefunden werden, ob die Einwirkzeit des Heparins bei den unterschiedlichen Heparinkonzentrationen einen Einfluss auf die Thrombozytenaggregation hat, was nachfolgend für die verschiedenen Messgeräte dargestellt wird.

4.3.3.1. Vergleich der Einflussfaktoren Konzentration und Zeit auf die Thrombozytenaggregation nach Messung am AACT 4™ Aggregometer

Wie in Tabelle 17 und Abbildung 42 ersichtlich ist, war die mittlere Aggregation zu den Zeitpunkten 0 und 60 Minuten nach Heparinzugabe bei einer Heparinkonzentration von 10 IE/ml deutlich niedriger als bei den niedrigeren Konzentrationen, jedoch war dieser Unterschied mit einem P-Wert von 0,16 statistisch nicht signifikant. Die Einwirkzeit des Heparins (0 Minuten, 60 Minuten) auf die Probe hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Aggregation ($P=0,69$).

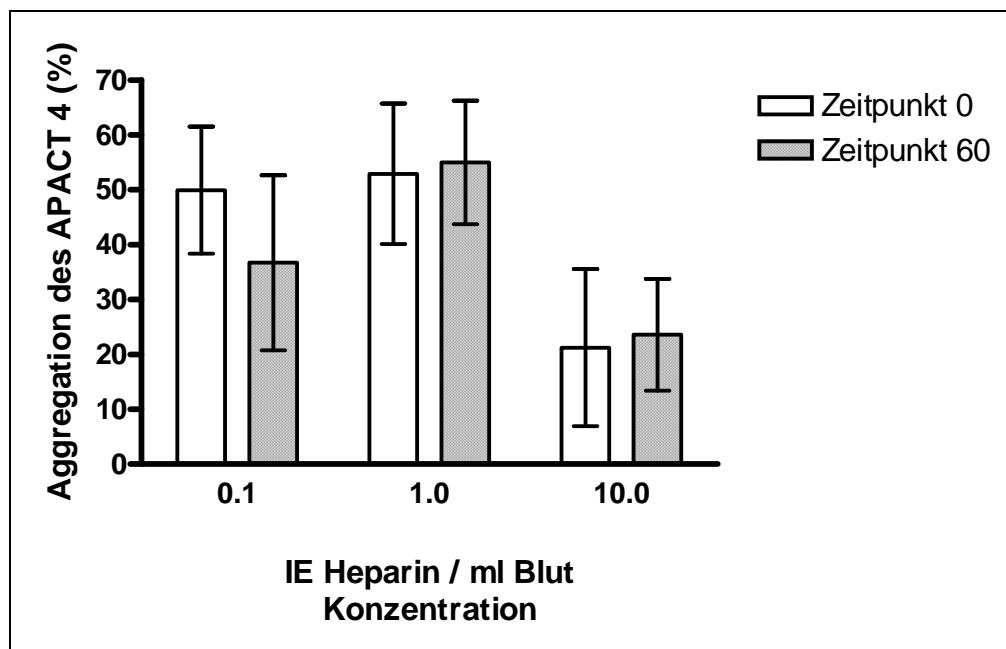


Abbildung 42: Mittelwert und Standardabweichung der mit dem AACT 4™ Aggregometer ermittelten prozentualen Aggregation zu den Zeitpunkten null und 60 Minuten bei drei unterschiedlichen Heparinkonzentrationen (n=6).

Tabelle 17: Ergebnisse der am ATRACT 4™ Aggregometer gemessenen prozentualen Aggregation bei verschiedenen Heparinkonzentrationen zu den Zeitpunkten 0 und 60 Minuten nach Heparinzugabe

Zeit	0 Minuten			60 Minuten		
	0,1 IE	1 IE	10 IE	0,1 IE	1 IE	10 IE
Mittelwert	49,92	52,90	21,23	36,72	54,97	23,58
SD	28,37	31,35	35,08	39,07	27,61	24,91

4.3.3.2. Untersuchung der Einflussfaktoren Heparinkonzentration und Einwirkzeit auf die am ADVIA 120™ gemessene Thrombozytenaggregation

Ähnlich wie bei den Daten des APACT 4™ Aggregometers war auch hier kein signifikanter Unterschied der Aggregation zwischen den einzelnen Heparinkonzentrationen ($P=0,04$) und den zwei Zeitpunkten ($P=0,46$) nachweisbar, obwohl die Mittelwerte der Aggregation für eine Heparinkonzentration von 10 IE/ml Blut zu beiden Messzeitpunkten niedriger waren als bei den geringeren Konzentrationen (Abbildung 43 und Tabelle 18).

Die Analyse der Daten mittels mehrfaktorieller Varianzanalyse ergaben ebenfalls keine statistisch signifikante Wechselwirkung zwischen Messzeitpunkt und Heparinkonzentration ($P=0,13$)

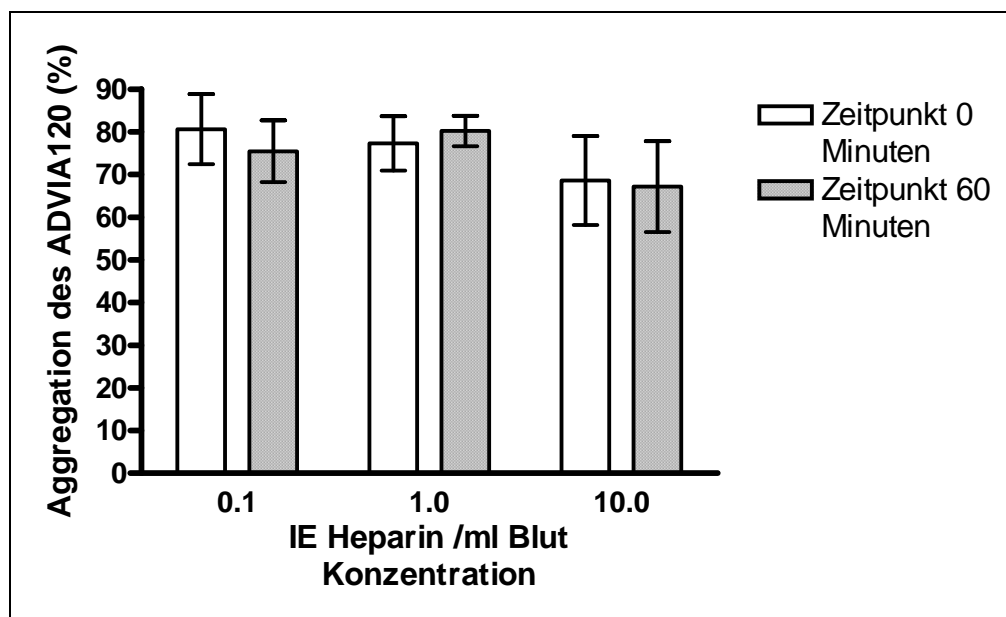


Abbildung 43: Säulendiagramm mit den Ergebnissen der am ADVIA 120™ gemessenen prozentualen Aggregation in den unterschiedlichen Heparinkonzentrationen zu den Zeitpunkten null und 60 Minuten mit der entsprechenden Standardabweichung

Tabelle 18: Messwerte der am ADVIA 120™ ermittelten Aggregation bei unterschiedlichen Heparinkonzentrationen zu den Zeitpunkten 0 und 60 Minuten nach Zugabe von Heparin

	0 Minuten			60 Minuten		
	0,1 IE	1 IE	10 IE	0,1 IE	1 IE	10 IE
Mittelwert	80,62%	77,28%	68,58%	75,43%	80,20%	67,17%
SD	20,09	15,54	25,47	17,69	8,719	26,14

4.3.3.3. Vergleich der Einflussfaktoren Heparin, Konzentration und Zeit auf die Thrombozytenaggregation nach Messung am VetABC™

Die nachfolgende Abbildung und Tabelle zeigen den Einfluss der Heparinkonzentration und der Zeit auf die Aggregation.

Ebenso wie bei den anderen Messmethoden war auch hier kein signifikanter Einfluss der Heparinkonzentration ($P=0,52$) und des Messzeitpunktes ($P=0,81$) auf die Aggregation nachweisbar. Weiterhin bestand auch hier keine Wechselwirkung zwischen den beiden Faktoren „Heparinkonzentration“ und „Zeit“ ($P=0,35$).

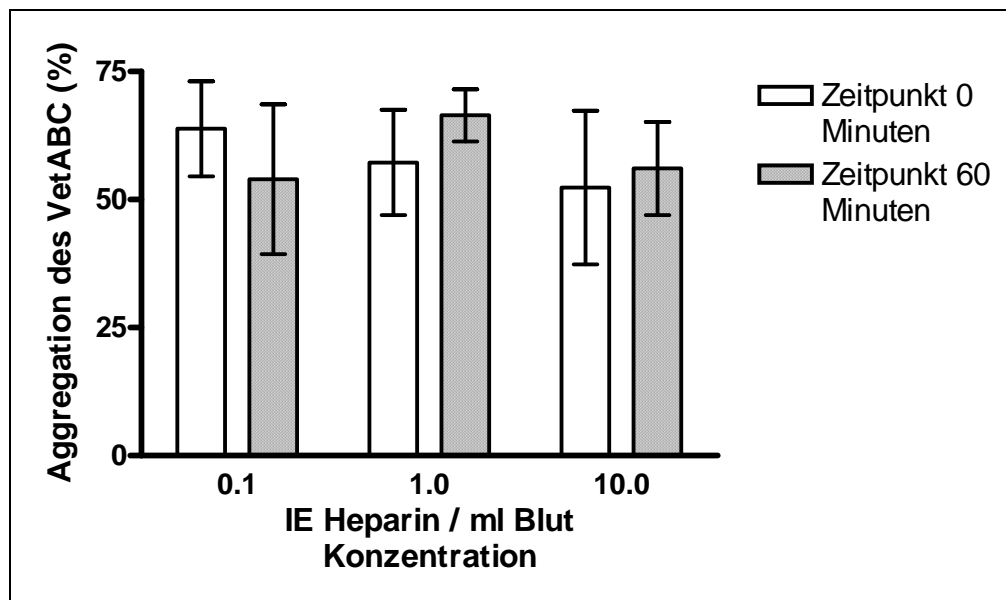


Abbildung 44: Illustration der prozentualen Aggregation in den unterschiedlichen Verdünnungen zu den Zeitpunkten null und 60 Minuten am VetABC™ mit der entsprechenden Standardabweichung als Säulendiagramm

Tabelle 19: Ergebnisse der am VetABC™ gemessenen Aggregation bei verschiedenen Heparinkonzentrationen zu den Zeitpunkten 0 und 60 Minuten nach Zugabe von Heparin

	0 Minuten			60 Minuten		
	0,1 IE	1 IE	10 IE	0,1 IE	1 IE	10 IE
Mittelwert	63,82%	57,23%	52,37%	53,98%	66,47%	56,07%
SD	22,71	25,20	36,73	35,81	12,48	22,25

4.4. Ergebnisse der Proben unter Einfluss von Acetylsalicylsäure (Gruppe 4)

Im 4. Teil dieser Arbeit soll der Einfluss von Acetylsalicylsäure in verschiedenen Konzentrationen auf die Thrombozytenaggregation untersucht werden. Die Ergebnisse werden in den nachfolgenden Punkten beschrieben.

4.4.1. Einfluss unterschiedlicher Acetylsalicylsäurekonzentrationen im Vergleich zur Kontrolle

In den folgenden Abbildungen und Tabellen sollen die Ergebnisse von drei unterschiedlichen Acetylsalicylsäurekonzentrationen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle dargestellt werden.

4.4.1.1. Einfluss der Acetylsalicylsäurekonzentration (ASS) auf die mittels APACT 4™ Aggregometer gemessene Aggregation

Die Zugabe von ASS führte in Konzentrationen von 0,5 mg/ml, 1 mg/ml und 2 mg/ml Blut zu einer hochsignifikanten Reduktion der Thrombozytenaggregation im Vergleich zum Ausgangswert (Abbildung 45, Tabelle 20, $P < 0,0001$). Dieser Effekt war im Bonferroni's multiple Comparison Test bei allen Konzentrationen im Vergleich zum Ausgangswert feststellbar.

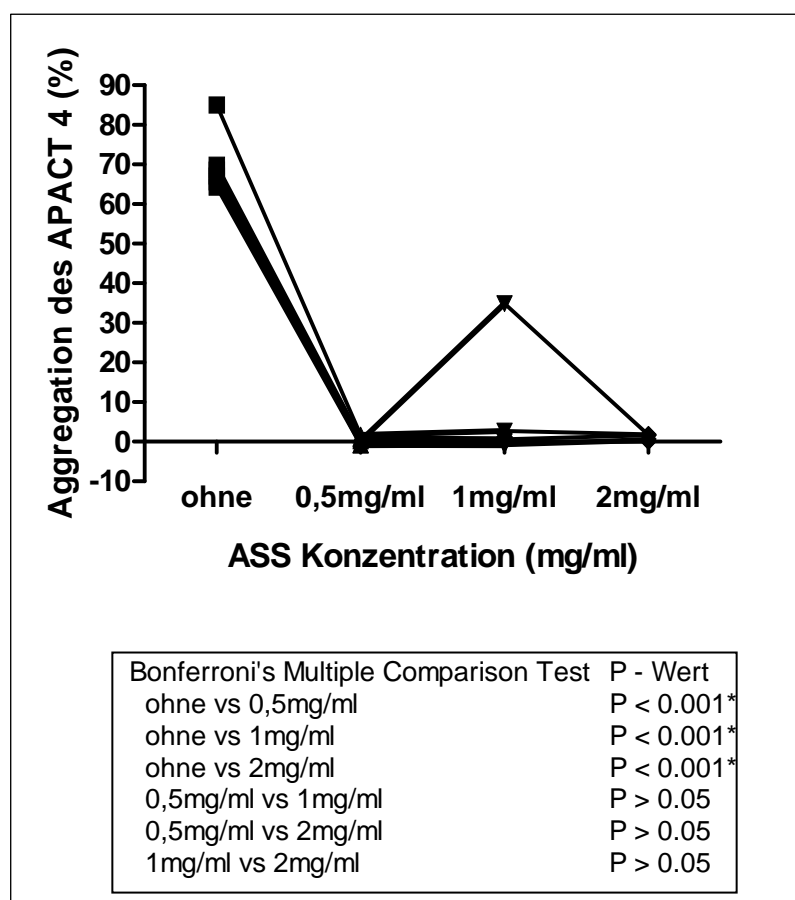


Abbildung 45: Einfluss verschiedener Acetylsalicylsäurekonzentrationen auf die mit dem APACT 4™ Aggregometer ermittelte prozentuale Aggregation (n=6). Die Resultate der einzelnen Probanden sind mit einer Linie verbunden.

Abkürzungen: ASS = Acetylsalicylsäure,

* = statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zum Ausgangswert

Tabelle 20: Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der mittels APACT 4™ Aggregometer gemessenen Aggregation für die unterschiedlichen Acetylsalicylsäurekonzentrationen im Vergleich zum Ausgangswert

	Ohne ASS	0,5mg/ml	1mg/ml	2mg/ml
Mittelwert	70,1%	0,3*	6,1*	1,0*
SD	7,6	1,0	14,2	0,8

Abkürzungen: *= statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zum Ausgangswert, ASS = Acetylsalicylsäure

4.4.1.2. Einfluss der Acetylsalicylsäurekonzentration (ASS) auf die mittels ADVIA 120™ gemessene Aggregation

Im Vergleich zu den mittels APACT 4™ gemessenen Aggregationswerten konnte bei der Vollblutaggregation mit dem ADVIA 120™ eine deutlich geringere Aggregationshemmung durch ASS festgestellt werden. Zudem war dieser Effekt individuell sehr unterschiedlich (Abbildung 46). Insgesamt zeigte sich ein statistisch signifikanter Einfluss der ASS-Konzentration auf die Aggregation ($P=0,0039$). Dieser Gesamteffekt resultierte aber ausschließlich aus der signifikanten Reduktion der Aggregation durch ASS in der höchsten Konzentration von 2 mg/ml Blut im Vergleich zum Ausgangswert ($P < 0,01$ Abbildung 46).

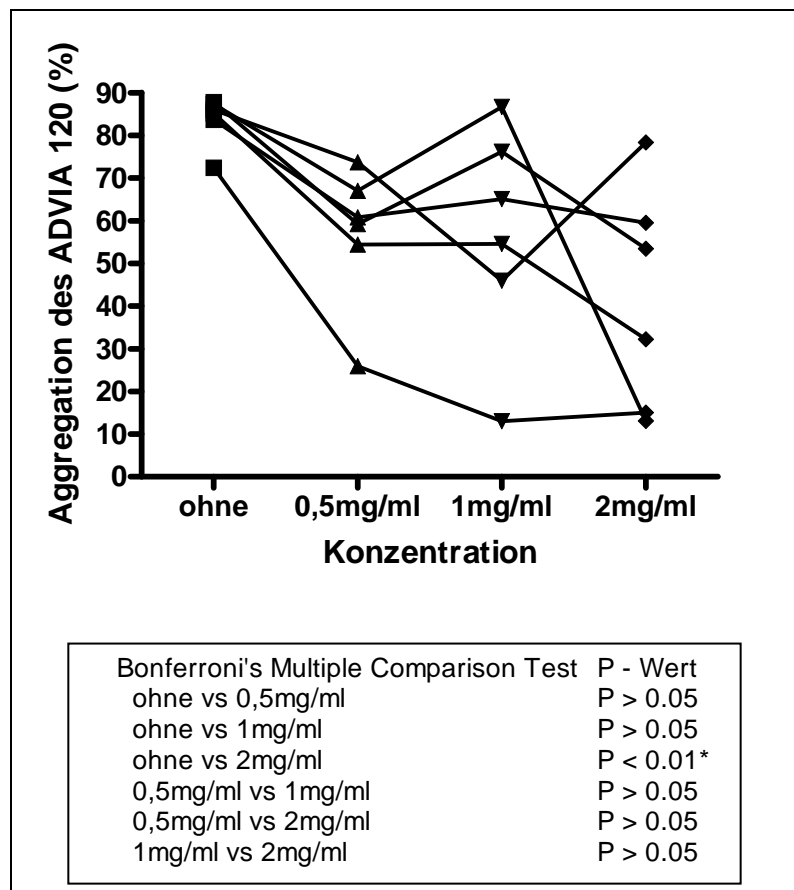


Abbildung 46: Einfluss verschiedener Acetylsalicylsäurekonzentrationen auf die mittels ADVIA 120™ ermittelten prozentualen Aggregation ($n=6$). Die Ergebnisse der einzelnen Probanden sind mit einer Linie verbunden.

Abkürzung* = statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Ausgangswert und der Konzentration von 2 mg/ml Blut

Tabelle 21: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der mittels ADVIA 120™ gemessenen prozentualen Aggregation in den unterschiedlichen Acetylsalicylsäurekonzentrationen im Vergleich zum Ausgangswert

	Ohne ASS	0,5mg/ml	1mg/ml	2mg/ml
Mittelwert	83,7%	56,8%	56,9%	41,9%*
SD	5,7	16,6	26,0	26,1

Abkürzung * = statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Ausgangswert und der Konzentration von 2 mg/ml Blut

4.4.1.3. Einfluss der Acetylsalicylsäurekonzentration (ASS) auf die mittels VetABC™ gemessenen Aggregation

Ebenso wie bei der Vollblutaggregometrie mittels ADVIA 120™ führte ASS nur in der höchsten Konzentration von 2 mg/ml Blut zu einer signifikanten Hemmung der am VetABC™ gemessenen Aggregation ($P < 0,05$, Abbildung 47, Tabelle 22). Auch hier waren große individuelle Unterschiede feststellbar (Abbildung 47).

Der Einfluss der Konzentration insgesamt zeigte sich mit einem p-Wert von 0,0093 einen signifikanten Unterschied.

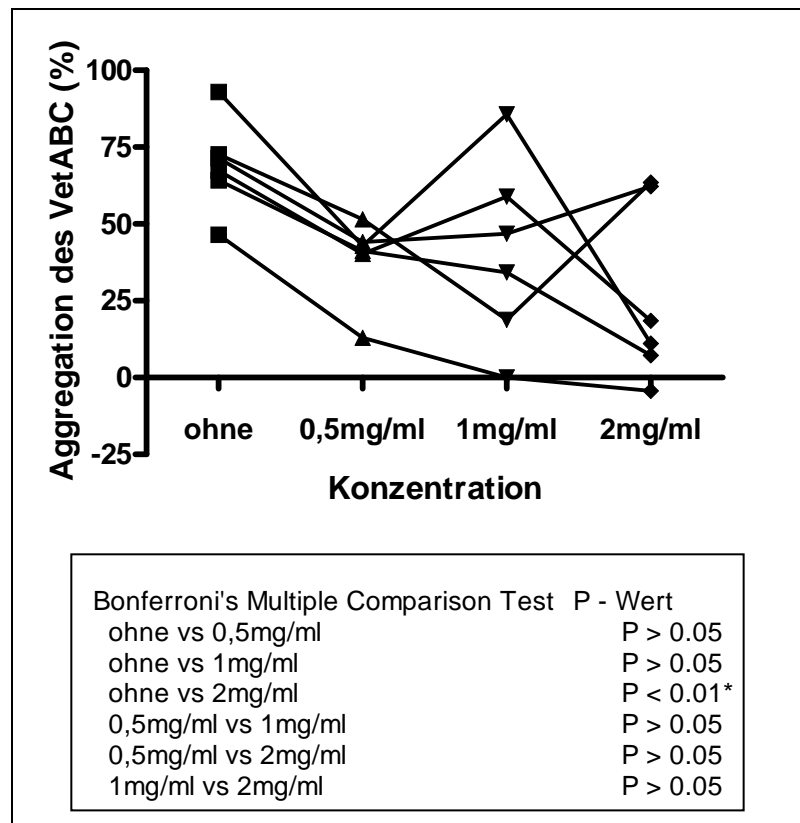


Abbildung 47: Einfluss verschiedener Acetylsalicylsäurekonzentrationen auf die mittels VetABC™ ermittelten prozentualen Aggregation ($n=6$). Die Ergebnisse der einzelnen Probanden sind mit einer Linie verbunden.

Abkürzung* = statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Ausgangswert und der Konzentration von 2 mg/ml Blut

Tabelle 22: Tabellarische Aufführung der Mittelwerte und Standardabweichungen der mittels VetABC™ ermittelten prozentualen Aggregation in den unterschiedlichen Acetylsalicylsäurekonzentrationen im Vergleich zum Ausgangswert

	Ohne ASS	0,5mg/ml	1mg/ml	2mg/ml
Mittelwert	69,2	38,8	40,7	26,4*
SD	15,02	13,27	30,24	29,21

Abkürzung * = statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Ausgangswert und der Konzentration von 2 mg/ml Blut

4.4.2. Methodenvergleich der einzelnen Geräte unter Einfluss von Acetylsalicylsäure im Vergleich zur unveränderten Probe

In diesem Teil der Studie wurde untersucht, ob unterschiedliche Konzentrationen an Acetylsalicylsäure den Unterschied zwischen den Messmethoden beeinflussen. Die Untersuchungsergebnisse werden nachfolgend für die einzelnen Geräte dargestellt.

4.4.2.1. Einfluss der ASS-Konzentration auf die Messwertunterschiede zwischen dem APACT 4™ Aggregometer und dem ADVIA 120™

Die Acetylsalicylsäurekonzentration zeigt mit einem P – Wert von 0,0118 einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Messwertunterschiede zwischen den Geräten. Im Bonferroni – Post - Test zeigte sich, dass dieser Gesamteffekt auf einen signifikanten Unterschied der Messwertdifferenzen zwischen beiden Geräten für ASS-Konzentrationen von 0,5 mg/ml und 1 mg/ml Blut im Vergleich zum Ausgangswert zurückzuführen war ($P < 0,05$).

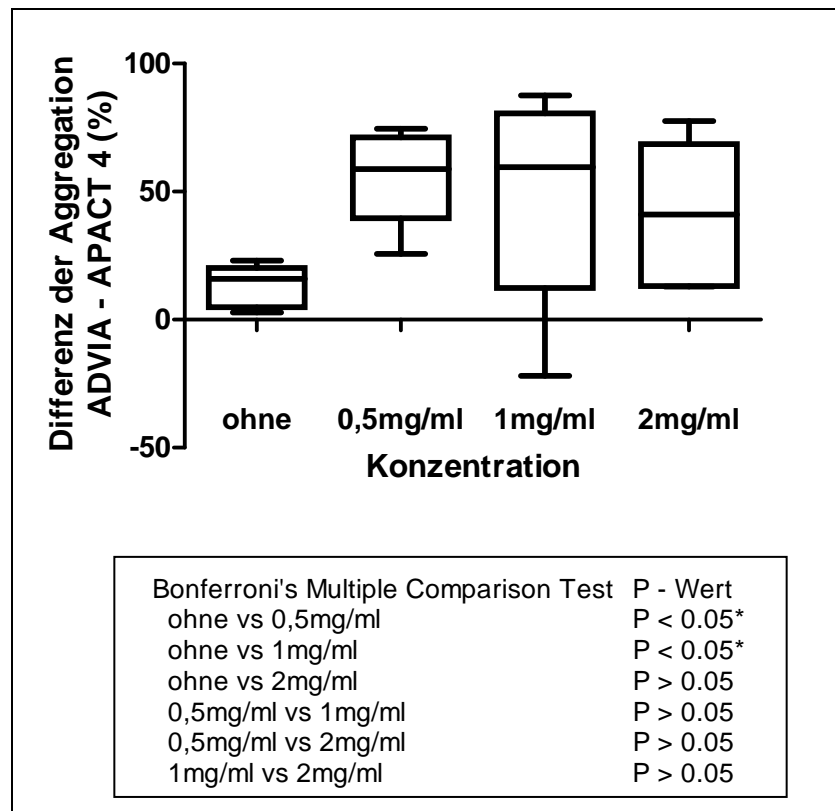


Abbildung 48: Messwertdifferenz von APACT 4™ Aggregometer und ADVIA 120™ für die unterschiedlichen ASS-Konzentrationen. Abkürzung: ASS= Acetylsalicylsäure, * = signifikanter Unterschied im Vergleich zum Ausgangswert

4.4.2.2. Einfluss der ASS-Konzentration auf die Messwertunterschiede zwischen dem APACT 4™ Aggregometer und dem VetABC™

Nach Analyse der Daten ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied in den Messungen der beiden Geräte (P-Wert von 0,0304). Der Bonferroni – post – Test zeigte einen signifikanten Unterschied bei dem Konzentrationsvergleich zwischen 0,5 mg/ml und dem Ausgangswert.

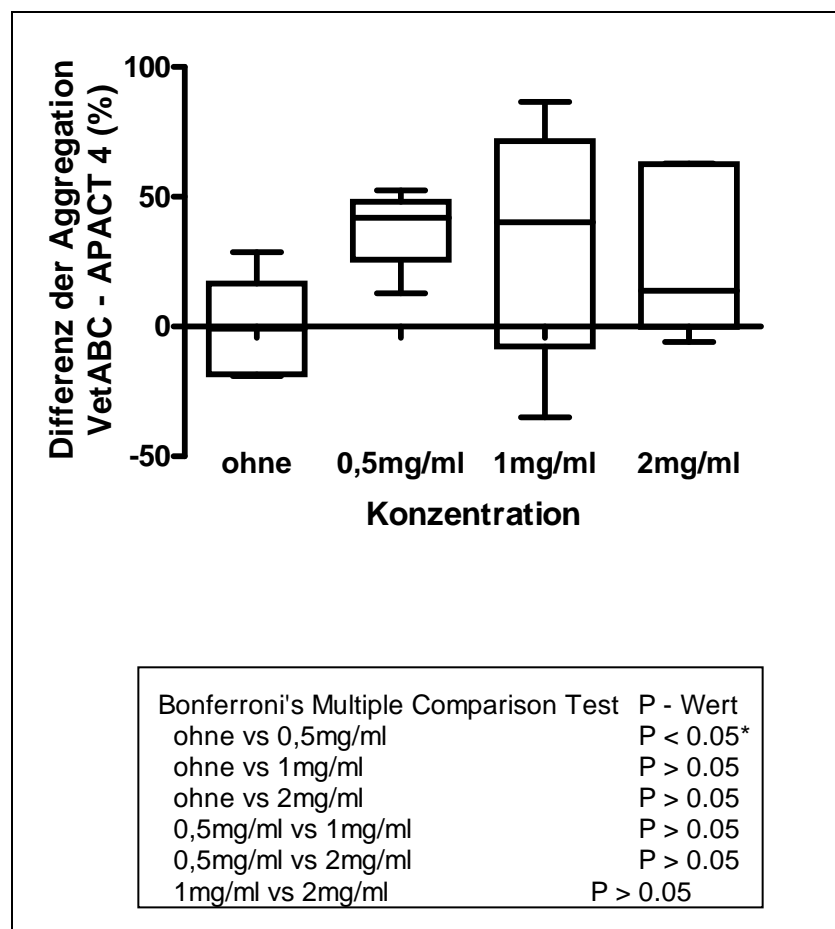


Abbildung 49: Darstellung der Differenz der prozentualen Aggregation des APACT 4™ Aggregometers und des VetABC™ in unterschiedlichen Acetylsalicylsäurekonzentrationen zum Methodenvergleich.

Abkürzung: ASS= Acetylsalicylsäure

* = signifikanter Unterschied im Vergleich zum Ausgangswert

4.4.2.3. Einfluss der ASS-Konzentration auf die Messwertunterschiede zwischen dem ADVIA 120™ und dem VetABC™

Als letztes erfolgte der Vergleich der Differenz zwischen ADVIA 120™ und VetABC™.

Nach dem Vergleich der Differenzen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied (P- Wert von 0,9271) nachgewiesen werden.

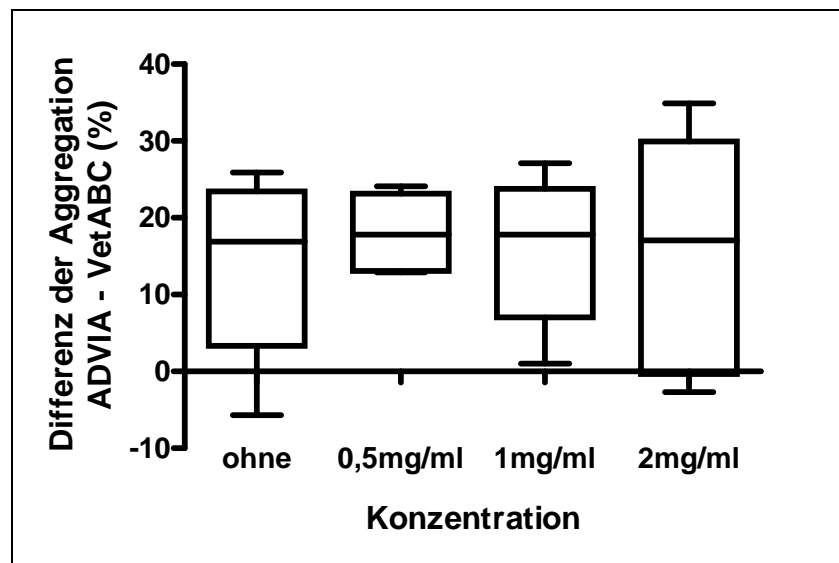


Abbildung 50: Graphische Dokumentation der Differenz der prozentualen Aggregation des ADVIA 120™ und des VetABC™ in unterschiedlichen Acetylsalicylsäurekonzentrationen zum Methodenvergleich.

4.4.3. Untersuchung der Einflussfaktoren Acetylsalicylsäurekonzentration und Einwirkzeit auf die Thrombozytenaggregation

Im Folgenden soll der Einfluss der Acetylsalicylsäurekonzentration und dessen Einwirkzeit auf die Thrombozytenaggregation für die drei Messgeräte dargestellt werden.

4.4.3.1. Vergleich der Einflussfaktoren Konzentration und Zeit auf die Thrombozytenaggregation nach Messung am APACT 4 Aggregometer

Insgesamt beeinflussten sowohl die ASS-Konzentration als auch deren Einwirkzeit die am APACT 4™ Aggregometer bestimmte Aggregation nicht signifikant ($P=0,40$ bzw. $0,5$). Zudem bestand zwischen den beiden Faktoren keine Wechselwirkung ($P=0,4$). Bei Betrachtung der Abbildung 51 und Tabelle 23 fällt jedoch auf, dass die mittlere Aggregation für eine ASS-Konzentration von 1 mg/ml direkt nach Zugabe der ASS deutlich höher war als bei den anderen Messzeitpunkten bzw. Konzentrationen. Auffällig war hier auch die extreme Varianz der Messresultate.

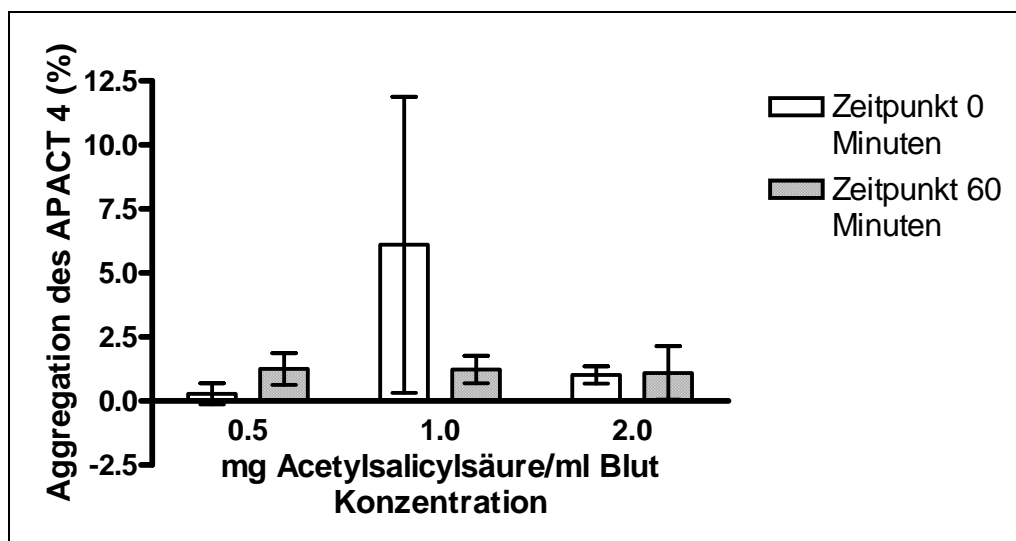


Abbildung 51: Beschreibung der prozentualen Aggregation in den unterschiedlichen Konzentrationen zu den Zeitpunkten 0 und 60 Minuten am APACT 4™ mit dem entsprechenden Mittelwert und Standardabweichungen als Säulendiagramm ($n=6$)

Tabelle 23: Ergebnisse der am APACT 4™ gemessenen prozentualen Aggregation bei verschiedenen Acetylsalicylsäurekonzentrationen zu den Zeitpunkten 0 und 60 Minuten nach Zugabe

	0 Minuten			60 Minuten		
	0,5mg/ml	1 mg/ml	2mg/ml	0,5mg/ml	1mg/ml	2mg/ml
Mittelwert	0,28	6,10	1,02	1,25	1,23	1,10
SD	1,01	14,17	0,82	1,51	1,33	2,55

4.4.3.2. Vergleich der Einflussfaktoren Konzentration und Zeit auf die Thrombozytenaggregation nach Messung am ADVIA 120™

Es wurde das Blut von sechs Probanden mit drei unterschiedlichen ASS – Konzentrationen und zwei Zeitpunkten am ADVIA 120™ gemessen.

Die Zugabe von ASS zu einer Vollblutprobe führt zu einer deutlich geringeren Hemmung der Thrombozytenaggregation als in plättchenreichem Plasma. Insgesamt zeigte die Höhe der ASS-Konzentration und ihre Einwirkzeit keinen signifikanten Einfluss auf die Aggregation ($P=0,11$ bzw. $P=0,13$).

Ebenso wie bei der Aggregometrie nach Born standen beide Faktoren nicht untereinander in Wechselwirkung.

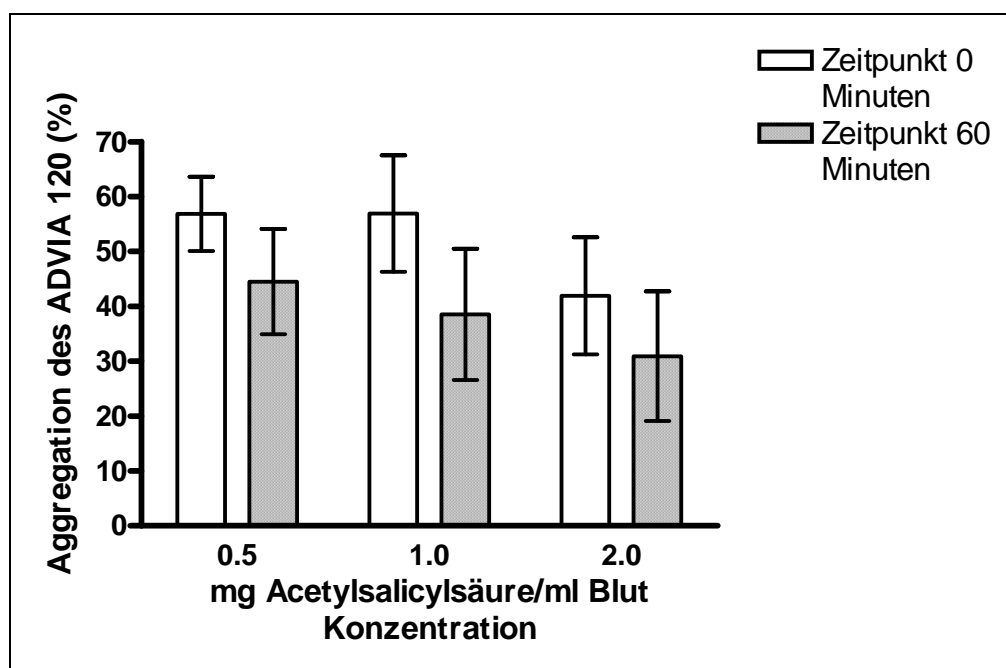


Abbildung 52: Mittelwert und Standardabweichungen der mit dem ADVIA 120™ ermittelten prozentualen Aggregation zu den Zeitpunkten null und 60 Minuten mit der entsprechenden Standardabweichung bei unterschiedlichen Acetylsalicylsäurekonzentrationen

Tabelle 24: Aufzeichnung der Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentualen Aggregationen des ADIVA 120™ unter verschiedenen Acetylsalicylsäurekonzentrationen zu den Zeitpunkten 0 und 60 Minuten nach Zugabe

	0 Minuten			60 Minuten		
	0,5mg/ml	1 mg/ml	2mg/ml	0,5mg/ml	1mg/ml	2mg/ml
Mittelwert	56,83%	56,92%	41,92%	44,50%	38,55%	30,91%
SD	16,57	26,01	26,13	23,51	29,29	28,91

4.4.3.3. Vergleich der Einflussfaktoren Konzentration und Zeit auf die Thrombozytenaggregation nach Messung am VetABC™

Es wurde das Blut von sechs Probanden mit drei unterschiedlichen ASS - Konzentrationen und zwei Zeitpunkten am VetABC™ gemessen.

Nach Messung der Proben am VetABC™ zeigten sich die Ergebnisse bezüglich der Konzentration mit einem P-Wert von 0,18 als statistisch nicht signifikant. Gleiches gilt für den zeitlichen Einfluss mit einem P-Wert von 0,31. Bei der Wechselwirkung zwischen Zeit und Konzentration konnte mit einem P-Wert von 0,42 ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

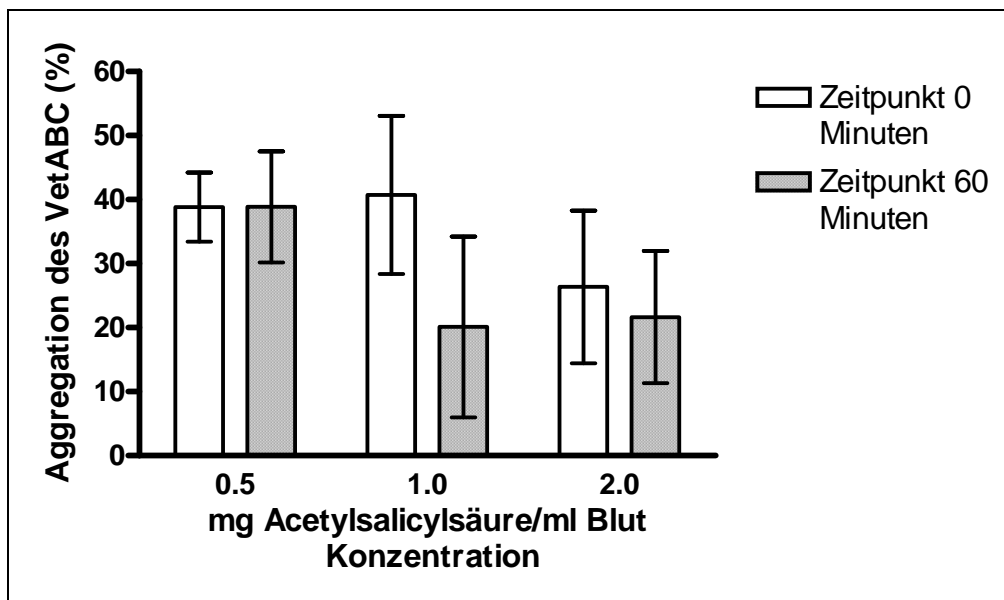


Abbildung 53: Säulendiagramm mit den Ergebnissen der am VetABC™ gemessenen prozentualen Aggregation in den unterschiedlichen Acetylsalicylsäurekonzentrationen zu den Zeitpunkten 0 und 60 Minuten mit der entsprechenden Standardabweichung

Tabelle 25: Darstellung der prozentualen Aggregation unter verschiedenen Acetylsalicylsäurekonzentrationen zu den Zeitpunkten 0 und 60 Minuten nach Zugabe am VetABC™. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen.

	0 Minuten			60 Minuten		
	0,5mg/ml	1 mg/ml	2mg/ml	0,5mg/ml	1mg/ml	2mg/ml
Mittelwert	38,83%	40,73%	26,37%	38,85%	20,12%	21,63%
SD	13,27	30,24	29,21	21,28	34,61	25,28

5. DISKUSSION

Die Thrombozytenfunktionstestung stellt aufgrund der dafür erforderlichen relativ aufwendigen Technik und der notwendigen schnellen Probenverarbeitungszeit kein Routineverfahren in der Veterinärmedizin dar. Für die Standardmethode, der Aggregometrie nach Born sind sowohl die Anschaffung eines Aggregometers und einer entsprechenden Zentrifuge zur Herstellung des plättchenreichen Plasmas notwendig, ebenso wie eine technische Einarbeitung in die Methodik (90).

In humanmedizinischen Kliniken hingegen ist die Aggregometrie schon lange ein wichtiges Diagnostikum zur Erkennung von Thrombozytopathien, die mit einer verminderten Thrombozytenfunktion einhergehen, insbesondere in Hinblick auf ein mögliches Blutungsrisiko während chirurgischer Eingriffe und zur Therapiekontrolle von Patienten, die Medikamente mit inhibitorischer Wirkung auf die Thrombozytenfunktion erhalten (108).

Humanmedizinische Studien dienen der Erforschung möglicher Parameter zur Früherkennung von Patienten mit Thromboseneigung. Hier stellt die Aggregometrie eine Möglichkeit zur Feststellung einer Hyperkoagulabilität infolge einer gesteigerten Thrombozytenfunktion dar (93).

In der Veterinärmedizin ist über Thrombozytopathien vergleichsweise wenig untersucht, da Thrombozytenfunktionsuntersuchungen nur in wenigen Labors durchgeführt werden können.

Ziel dieser Studie war es zu überprüfen, ob die Vollblutaggregation mit verschiedenen Hämatologiegeräten ein praxisrelevantes Verfahren zur Thrombozytenfunktionsmessung beim Hund darstellt.

Nachfolgend werden die Resultate der vier Teile der Studie diskutiert.

5.1. Prozentuale Aggregation bei unterschiedlichen Kollagenkonzentrationen

Da in dieser Arbeit eine 10fach höhere Dosis für die Vollblutaggregation angewendet wurde, als in der Literatur als ideal angegeben wird (106), um eine Vergleichbarkeit beider Methoden zu erhalten, wurde zuerst ermittelt, ob ein statistisch signifikanter Unterschied der Thrombozytenaggregation bei verschiedenen Kollagenkonzentrationen nachzuweisen ist. In der Auswertung zeigen sich zwischen

den Konzentrationen 1 µg/ml und 10 µg/ml keine statistisch signifikanten Unterschiede. In der graphischen Darstellung fällt eine niedrigere durchschnittliche Aggregation zwischen der Konzentration von 0,5 µg/ml und den restlichen Konzentrationen (1,0; 5,0 und 10,0 µg/ml) auf. Es muss angemerkt werden, dass es trotz des fehlenden Unterschiedes zwischen den einzelnen Konzentrationen in unserer Studie sinnvoll ist verschiedene Konzentrationen einzusetzen, wenn der Verdacht auf eine Thrombozytopathie vorliegt. Hohe Konzentrationen eines Aggregationsinduktors können milde Thrombozytenfunktionsstörungen kaschieren, so dass diese Störungen möglicherweise erst in niedrigeren Dosisbereichen auffallen (16).

Im Rahmen dieser Studie wurde die Thrombozytenaggregation bei gesunden Hunden überprüft, bei denen kein Verdacht auf eine Thrombozytenfunktionsstörung bestand. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die Messunterschiede zwischen den eingesetzten Hämatologiegeräten und dem Aggregometer unabhängig von der Konzentration des Aggregationsinduktors interpretiert werden müssen.

5.2. Prozentuale Aggregation bei gesunden Probanden (Gruppe 1)

Der mit der Methode nach Born gemessene Referenzbereich betrug 49 – 105% (n=31 Hunde). In den Untersuchungen von Mischke und Schulze wird der Referenzbereich für gesunde Hunde bei gleicher Methode, Art und Konzentration des Induktors mit 80-96% (n=75) angegeben (45). In unserer Untersuchung zeigte die Methode nach Born die größte Standardabweichung mit 14,08%, womit sich auch der breite Referenzbereich erklärt. Im Vergleich dazu lag die Standardabweichung der mit dem ADVIA 120 bestimmten durchschnittlichen Aggregation bei 3,06% (Referenzbereich 84-96%) und für den VetABC bei 8,35% (Referenzbereich 69-96%).

Eine mögliche Erklärung für die beobachtete größere Varianz der Ergebnisse bei der Aggregometrie nach Born ist die dafür erforderliche Behandlung der Probe vor den Messungen. So kommt es durch das Zentrifugieren, Abpipettieren und Messen von plättchenreichem Plasma zur Aktivierung der Thrombozyten (91). Thrombozyten, die so einen bestimmten Aktivierungsgrad erreicht haben, können in der eigentlichen Messung nicht mehr aggregieren, woraus falsch-niedrige Messwerte resultieren.

Weiterhin ergeben sich Fehlerquellen durch kleine Luftblasen, Trübungen des Plasmas und residuale Erythrozyten (108). Ebenso wird in der Literatur diskutiert, ob Thrombozyten in ihrem physiologischen Milieu eine abweichende Aggregation im Vergleich zur Methode nach Born zeigen (16).

Als weiteres muss man erwägen, dass unterschiedliche Messmethoden, wie eine errechnete Aggregation im Gegensatz zu einer photometrisch gemessenen Aggregation zu unterschiedlichen Referenzbereich führen können.

Zusätzlich ist zu erwähnen, dass bei mehreren Messwiederholungen sehr unterschiedliche Ergebnisse in der Aggregation gefunden wurden. So wurden einige Messungen (16,1%) wiederholt, da mehrere erste Messungen keine oder nur eine unzureichende Aggregation zeigten. Eine Erklärung für die verminderte Aggregation konnte nicht gefunden werden, da nach Wiederholungsmessungen mit der gleichen Probe und der gleichen Charge an Aggregationsinduktor eine normale Aggregation nachgewiesen werden konnte. So muss festgehalten werden, dass diese Methode der Thrombozytenaggregation am besten mit zwei oder drei Messwiederholungen durchgeführt werden sollte, wenn genügend Probenmaterial vorhanden ist.

Als weiterer Nachteil zeigte sich die Herstellung von plättchenreichem Plasma (PRP). Bei einigen Hunden (n=3) konnte durch die Zentrifugation keine ausreichende Menge an PRP hergestellt werden oder das Plasma enthielt zu wenig Thrombozyten für eine Messung. Auffällig war, dass dies insbesondere bei Tieren der Rasse Deutscher Schäferhund (n=2) auftrat (Ursache bisher nicht geklärt), so dass diese aus der Studie ausgeschlossen werden mussten. Vergleicht man die beiden Hämatologiegeräte untereinander, liegt die mit dem Hämatologiegerät VetABC™ bestimmte mittlere Aggregation mit $82,54\% \pm 8,351$ deutlich geringer als die mit dem ADVIA 120™ gemessenen Aggregationswerte ($89,88\% \pm 3,06$).

Aus dem Bland-Altman Diagramm wird sichtbar, dass dies bei fast allen Einzelmesswerten der Fall war. Weiterhin war ein deutlicher proportionaler Fehler erkennbar d.h. die Diskrepanz zwischen den Messwerten war besonders hoch im niedrigen Aggregationsbereich. Vergleichbare Ergebnisse liegen in der Literatur nicht vor, da dies die erste Studie ist, in der zwei Hämatologiegeräte bezüglich ihres Nutzens für die Vollblutaggregometrie verglichen wurden. Das Vorliegen eines proportionalen Fehlers deutet jedoch darauf hin, dass die unterschiedlichen Messwerte auf die Messmethodik zurückzuführen sind (109).

Während die Messung der Thrombozyten beim ADVIA 120™ durch eine Laserstreulichtmessung erfolgt, bei der Zellen anhand ihrer Größe und Granularität erkannt werden, arbeitet der VetABC™ mit der Impedanzmethode. Mit dieser Messmethode wird ausschließlich die Zellgröße zur Einteilung der Zellen herangezogen (98). Auf diese Weise ist bei der Impedanzmethode die Gefahr größer, dass Zellfragmente fälschlicherweise als Thrombozyten detektiert werden, was in falsch hohen Thrombozytenzahlen und somit in einer falsch niedrigen Aggregation resultiert.

5.2.1. Vergleich der Geräte

Der Vergleich der prozentualen Aggregation von ADVIA 120™ und APTACT 4™ Aggregometer zeigt in den durchgeführten Untersuchungen einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,08$, was für keine Korrelation der Ergebnisse spricht. In der vergleichbaren Studie von Pinkowski und Mitarbeitern war eine bessere, aber auch als mäßig zu beurteilende Korrelation von 0,612 bei gesunden Probanden (95).

Obwohl die lineare Regressionsanalyse traditionsgemäß in den meisten Studien zur Feststellung einer Korrelation zwischen den mit zwei Laborgeräten ermittelten Messwerten herangezogen wird, ist diese Methode dazu nur bedingt geeignet (109). Dies liegt daran, dass die Höhe des Korrelationskoeffizienten entscheidend durch die Streubreite der Messwerte beeinflusst wird. Ist diese hoch, wird automatisch auch ein höherer Korrelationskoeffizient ermittelt und - umgekehrt bei einer niedrigen Streubreite - ein geringer (110).

Da bei gesunden Probanden nur eine geringe Streuung der Aggregationswerte vorliegt, ist der Korrelationskoeffizient erwartungsgemäß gering (109). In der Darstellung im Bland-Altman-Diagramm zeigt sich die größte Abweichung der Ergebnisse im Bereich von 70-80% der Aggregation. Der proportionale Fehler deutet auf eine methodenbedingte Ursache für die ungenügende Übereinstimmung der Ergebnisse hin. Es zeigt sich weiterhin, dass die Standardabweichungen in der Aggregometrie nach Born deutlich höher lag (14,08%), als bei den Messungen an beiden Hämatologiegeräten (ADVIA 120™: 3,06, VetABC™ 8,35). Möglicherweise wird für die Vollblutaggregometrie eine geringere Induktorkonzentration benötigt, um

eine maximale Aggregation zu erzielen, so dass aufgrund der „gesättigten Probe“ eine geringe Varianz der Ergebnisse auftritt, als in der Methode nach Born. Trotzdem hat sich in unserer Studie gezeigt, dass die Aggregometrie nach Born insgesamt eine schlechtere Wiederholbarkeit zeigt.

Analog zeigt sich im Vergleich zwischen APACT 4™ Aggregometer und VetABC™ ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,34$. Auch hier lässt sich im Bland-Altman-Diagramm (Abbildung 20) ein proportionaler Fehler erkennen. Der ADVIA 120™ liefert in den Messungen fast ausschließlich höhere Werte, als der VetABC™. Dies bezieht sich vor allem auf den Aggregationsbereich zwischen 70-85%, so dass auch hier der Verdacht auf einen methodenbedingten Unterschied vorliegt. Möglicherweise liegt der Unterschied in der impedanz- bzw. lasergestützten Zellerkennung.

5.3. Vergleich der Thrombozytenparameter vor und nach Aggregation am ADVIA 120™

Hier sollen die Auswirkungen einer Thrombozytenaggregation- und Aktivierung auf die Thrombozytenparameter des ADVIA 120™ evaluiert werden.

Mit Ausnahme der Thrombozytenaggregate gilt für alle Parameter, dass die Zugabe eines Aggregationsinduktors einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Thrombozytenparameter hatte, was in den folgenden Abschnitten diskutiert werden soll.

Im Vergleich von Citrat und Kontrolle sollte ausgeschlossen werden, dass die Behandlung, bzw. das alleinige Pipettieren von Flüssigkeiten zur Probe einen Einfluss auf die Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten zeigen. Im Rahmen dieser Studie konnte das ausgeschlossen werden, da für alle Parameter im Vergleich zwischen Citrat und Kontrolle kein statistisch signifikanter Unterschied feststellbar war. In der Humanmedizin finden sich Studien über die Veränderung des MPC, PCDW und MPV nach Aktivierung (100) (111) (101) (103) im Sinne eine Aktivierung der Thrombozyten, die in dieser Studie bestätigt werden konnten. In der Veterinärmedizin wurden bisher der MPC als Mass der Aktivierung der Thrombozyten mit der Expression von p-Selektin verglichen (102). Es zeigt sich dort ebenfalls ein Abfall des MPCs bei zunehmender Aktivierung. Insofern stimmen die

Ergebnisse dieser Studie mit der Literatur überein. Die restlichen Thrombozytenparameter wurden in der Literatur bisher nicht publiziert.

5.3.1. Mittleres Thrombozytenvolumen - MPV

Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg des mittleren Thrombozytenvolumens nach der Aggregation (Abbildung 23). Dies lässt sich nicht durch die Aktivierung der Thrombozyten erklären. Während der Aktivierung kommt es zwar zu einer Konformationsänderung der Zellen, die dann degranulieren und sich aufkugeln und Filopodien ausbilden (8), was allerdings nicht zu einer Volumenzunahme der Zelle führt. In Untersuchungen von Moritz und Weiss wurde in durchflusszytometrischen Untersuchungen gezeigt, dass Thrombozyten nach der Aktivierung keine Volumenzunahme zeigten (102). Eine Erklärung für die Zunahme des Thrombozytenvolumens wäre daher, dass nach der Aggregation kleine Aggregate (Dupletes oder Triplets von Thrombozyten) vom ADVIA 120™ als einzelne Thrombozyten gemessen werden, so dass das Volumen sich vergrößert. Diese konnten in den ausgewerteten Ausstrichen auch nachgewiesen werden.

5.3.2. Mittlere Konzentration innerer Thrombozytenbestandteile – MPC

Die mittlere Konzentration innerer Thrombozytenanteile als Maß für die Aktivierung der Thrombozyten fiel nach Zugabe des Aggregationsinduktors statistisch signifikant ab (Abbildung: 24). Dies ist auf die Aktivierung der Thrombozyten zurückzuführen. Durch die Aktivierung kommt es zur Degranulation und somit zum Absinken des MPC (111). Acht Minuten nach Induktion der Aggregation fanden sich somit aktivierte aber nicht aggregierte Thrombozyten. In verschiedenen human- und tiermedizinischen Studien wurde die Veränderung des MPC nach Aktivierung der Thrombozyten mit der Expression von P-Selektin als Maß für die Aktivierung verglichen (100) (101) (111) (102). Es konnte eine gute Korrelation zwischen P-Selektin und MPC festgestellt werden. Eine Erniedrigung des MPC durch Aktivierung von Thrombozyten zeigte sich auch in dieser Studie.

5.3.3. Verteilungsbreite der mittleren inneren Thrombozytenbestandteile - PCDW

Die Induktion der Aggregation führte zu einem signifikanten Absinken des PCDW , d.h. zu einer geringeren Verteilungsbreite des MPC (Abbildung 24). Das Absinken des PCDW ist ein Hinweis auf das Vorhandensein von Thrombozyten mit geringer Varianz des MPC und somit des Aktivierungsgrades nach Induktion der Aggregation, so dass am Ende der Messung nur noch wenige Thrombozyten des gleichen Aktivierungsgrades in der Probe nachgewiesen werden können. Die Untersuchung von Boos und Mitarbeitern konnten ebenfalls eine Erniedrigung des PCDWs bei zunehmender Aktivierung von Thrombozyten nachweisen (103).

5.3.4. Große Thrombozyten – large PLT

Große Thrombozyten werden nur bei oxidativem Stress unter chronischem Einfluss von Zytokinen gebildet (112). Weder junge noch aktivierte Thrombozyten zeigen in Studien eine Größenzunahme im Vergleich zu adulten oder inaktiven Plättchen (112) (102). In unseren Untersuchungen fiel nach erfolgter Aggregation ein statistisch signifikanter Abfall der großen Thrombozyten in der Probe auf. Da die large platelets nicht als prozentualer Anteil an den Thrombozyten sondern einzeln gezählt werden, erklärt sich ihr statistisch signifikantes Absinken aufgrund der geringen Gesamtthrombozytenzahl nach erfolgter Aggregation.

Vergleicht man allerdings die Anzahl mit der Gesamtthrombozytenzahl in der Probe zeigt sich ein signifikanter Anstieg ihres relativen Anteils nach Induktion der Aggregation. Da junge Thrombozyten in der Regel eine höhere Reaktivität zeigen und daher nach der Aggregation nicht mehr in der Probe zu erwarten sind (112) und Thrombozyten durch die Aktivierung nicht größer werden, ist (wie oben schon ausgeführt wurde) anzunehmen, dass wie bei den Untersuchungen des MPV Duplets oder Triplets von Thrombozyten vorliegen, die vom ADVIA 120 als große Thrombozyten gemessen werden. Das Vorliegen von Kleinstaggregaten von Thrombozyten konnte in den untersuchten Blutaussstrichen bestätigt werden.

5.3.5. Thrombozytenverteilungsbreite – PDW

Die Verteilungsbreite der Thrombozytengröße wird durch den PDW angegeben. Der PDW stieg nach der Aggregation statistisch signifikant an (Abbildung: 28). Dies ist ein Hinweis auf das Vorliegen von Thrombozyten unterschiedlicher Größe am Ende der Messung. In Studien, die Proben von Menschen mit Thrombozytopenien untersuchten, wurden ebenfalls aufgrund der durch eine erhöhte Regeneration vergrößerten Thrombozyten ein Anstieg der Thrombozytenverteilungsbreite festgestellt (113). Wie bereits erwähnt zeigen große Thrombozyten beim Hund nur eine Größenzunahme unter Einfluss von Zytokinen (112) und nicht bei normaler Regeneration (112) oder Aktivierung (102), daher ist hier, wie auch bei den Untersuchungen des MPV und der large platelets, anzunehmen, dass es durch das Vorhandensein von Duplets oder Triplets (wie vorher aufgeführt) zu einer Veränderung der Thrombozytenverteilungsbreite kommt.

5.3.6. Große peroxidase negative Zellen – LUCs

Die Population der sogenannten „large unstained cells“ (LUCs) sind große peroxidasenegative Zellen, die am ADVIA 120™ im Perox-Scattergramm dargestellt werden. Normalerweise werden in diesem Bereich Blasten und reaktive Lymphozyten angezeigt. Da die Proben vor der Aggregation keine dieser Zellen aufwies, ist anzunehmen, dass es sich um Thrombozytenaggregate handelt, die als „große Leukozyten“ gezählt werden, da die Anzahl der LUCs nach der Aggregation statistisch signifikant zunahm (Tabelle 31). Da Thrombozyten keine Peroxidase Aktivität zeigen, werden sie im Bereich der LUCs dargestellt (Abbildung: 30b des Leukozytenscatters). Mittels der untersuchten Blutausstriche konnten andere Ursachen als das Auftreten von Thrombozyten – Leukozyten – Aggregaten für das Auftreten der LUCs ausgeschlossen werden.

5.3.7. Thrombozytenaggregate – Clumps

Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen resultierte die Induktion der Aggregation überraschenderweise in keiner signifikanten Zunahme der vom ADVIA 120™ gemessenen Zahl der Thrombozytenaggregate (Clumps). Möglicherweise lässt sich dies dadurch erklären, dass die Thrombozytenaggregate zu groß waren, um als Clumps erkannt zu werden und stattdessen im Bereich der LUCs des Leukozytenscatters als peroxidasenegative „Zellen“ detektiert wurden.

5.4. Einfluss der Anämie auf die Thrombozytenaggregation (Gruppe 2)

Im Gegensatz zur Messmethode nach Born, bei der plättchenreiches Plasma ohne Erythrozyten zum Einsatz kommt, wurde in der Literatur eine Beeinflussung der Messung der Thrombozytenfunktion im Vollblut bei anämischen Patienten beschrieben. Diese Angaben bezogen sich auf den PFA-100™ (Dade Behring, Liederbach), einen Thrombozytenfunktionsanalyser, bei dem die Thrombozytenfunktion mittels Verschlusszeiten an einer biologisch aktiven Membran gemessen wird. Hier konnte bei Menschen eine negative Korrelation zwischen dem Hämatokrit und der Länge der Verschlusszeit nachgewiesen werden (94). Mischke und Keidel untersuchten 2003 den Einfluss des Hämatokrits auf die Messung mit dem PFA-100™ und stellten auch eine negative Korrelation des Hämatokrits und der Verschlusszeit beim Hund fest. So konnte schon bei einer Erniedrigung von 0,10 l/l ein signifikanter Abfall der Verschlusszeit registriert werden. Dies wird durch die erniedrigte Viskosität und dadurch einer erhöhten Flussgeschwindigkeit des Blutes erklärt (114). Dagegen wurden die Ergebnisse der Vollblutaggregometrie mittels ADVIA 120™ und VetABC™ nicht signifikant durch die simulierte Anämie beeinflusst. Da bei dieser Methode keine Verschlusszeiten, sondern die reine Thrombozytenaggregation gemessen wird, sind bei sonst physiologischer Thrombozytenfunktion keine Veränderungen der Aggregation zu erwarten.

Auffällig war ein Hund der sowohl bei der Untersuchungen in der anämischen Probe, als auch bei den Untersuchungen mit Heparin und Aspirin eine deutlich geringere Aggregation zeigte, als die anderen Probanden. Als Erklärung hierfür käme eine fehlerhafte Probenentnahme in Frage, allerdings zeigten sich bei diesem Hund keine

Veränderungen in der physiologischen Aggregation. Erst als sich die Verhältnisse in der Probe änderten (Verdünnung zur Herstellung einer simulierten Anämie, bzw. Zugabe von ASS oder Heparin), fiel die prozentuale Aggregation im Vergleich zu den anderen Hunden ab. Eine fehlerhafte Probenverarbeitung ist zwar möglich, erscheint aber aufgrund der Veränderungen in drei verschiedenen Probenansätzen unwahrscheinlich. Möglicherweise liegt bei diesem Hund eine leichtgradige Thrombozytopathie vor, die bei idealen Verhältnissen weder klinisch noch labordiagnostisch zum Tragen kommt, allerdings offensichtlich wird, wenn sich die Bedingungen in der untersuchten Probe ändern.

5.5. Einfluss von Heparin auf die Thrombozytenaggregation (Gruppe 3)

Wie bereits in der Literaturübersicht beschrieben ist, kann Heparin beim Menschen in einer physiologischen Dosierung (0,25 IE/ml) zu einer Aktivierung der Thrombozyten führen (72), während sich höhere Dosierungen (100IE/ml) hemmend auf die Thrombozytenaggregation auswirken (73). Allerdings wurde in letzterer Studie auf die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen bezüglich niedrigerer Konzentration von Heparin hingewiesen, da Dosierungen über 100 IE/ml kaum bzw. nicht *in vivo* eingesetzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Auswirkung von Dosen im therapeutischen Bereich (0,1 bis 10 IE/ml) auf die Thrombozytenfunktion getestet. Beide oben genannten Studien arbeiteten allerdings mit einer Zugabe von Heparin *in vitro*. In der Studie von Mischke und Mitarbeitern (2000) konnte nach Gabe von 1000 IE/kg Heparin beim gesunden Hund eine Plasmakonzentration von 1,2 IE/ml erreicht werden. Die Aggregationsmessung mit der Methode nach Born erbrachte dort allerdings keine signifikanten Unterschiede zu den Messungen vor der Heparingabe. In der Dissertation von Leuser zeigte sich eine deutliche Abnahme der Aggregation ab einer Dosierung von 100IE/kg mit dem Aggregationsinduktor Kollagen (Methode nach Born) beim Schwein (77).

Beim Vergleich der einzelnen Heparinkonzentrationen untereinander, konnte bei keinem der Geräte ein statistisch signifikanter Unterschied in den Messergebnissen gefunden werden. Die Einwirkzeit von einer Stunde hatte ebenfalls keine Auswirkungen. Dies widerspricht der Studie von Leuser, bei der sich ein Abfall der

Aggregationswerte zeigte, je länger das Heparin wirkte. Allerdings handelte es sich hier um eine *in vivo* – Studie beim Schwein (77). Am ADVIA 120™ und am VetABC™ zeigte sich unter Zugabe von 0,1 IE/ml Heparin ein geringgradiger Anstieg des Mittelwertes der prozentualen Aggregation, während sich die Konzentrationen von 1 IE und 10 IE/ml hemmend auf die Aggregation auswirkten. Allerdings wurde nur für die Konzentration von 10 IE/ml Heparin am ADVIA 120™ eine statistisch signifikant hemmende Wirkung im Vergleich zur Dosis von 0,1 IE/ml gefunden. Dies erklärt sich daraus, dass der Mittelwert der Aggregation vergleichend zum Ausgangswert anstieg. Diese Beobachtungen an den Hämatologiegeräten stimmen mit den oben aufgeführten Literaturquellen überein, da auch hier eine niedrige Dosis von Heparin aktivierend und hohe Dosen hemmend auf die Thrombozytenaktivierung und –aggregation einwirkt (73) (72).. Dass die Ergebnisse nicht bei allen Konzentrationen statistisch signifikante Unterschiede aufwiesen, ist unter Umständen auf die geringe Patientenzahl zurückzuführen. Die Ausnahme stellt die Aggregometrie mit dem AACT 4™ dar, bei dem nach Zugabe von Heparin in allen Konzentrationen eine niedrigere Aggregation ermittelt wurde. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte aber nur beim Vergleich der Konzentration von 10 IE/ml und der Kontrolle gefunden werden. Diese Erniedrigung der Aggregation stimmt sowohl mit der Literatur als auch mit den Ergebnissen des ADVIA120™ überein (73).

5.6. Einfluss von Acetylsalicylsäure auf die Thrombozytenaggregation (Gruppe 4)

Die Zugabe von Acetylsalicylsäure (ASS) führte bei der Aggregometrie nach Born zu einem statistisch signifikanten Absinken der Thrombozytenaggregation ($P < 0,0001$). Am AACT 4™ Aggregometer zeigte sich eine statistische Signifikanz von allen drei Konzentrationen im Vergleich zum Ausgangswert. Wie in der Literatur angegeben ist, wird durch die Acetylsalicylsäure die Aggregationshemmung durch die Hemmung der Thromboxansynthese erreicht (8).

Die Ergebnisse der Hämatologiesysteme und des Aggregometers unterscheiden sich deutlich. Während am Aggregometer eine signifikante Erniedrigung der Aggregation bei allen Konzentrationen nachzuweisen ist, zeigen sich bei den Messungen an

VetABC und ADVIA 120 deutliche individuelle Unterschiede (Abbildung 47 und 46). So ist die Ursache entweder in dem Substrat (Vollblut versus PRP) oder in der Methodik der Untersuchung zu suchen. Letzteres ist wahrscheinlicher, da bei der Präparation von plättchenreichem Plasma nicht zu erwarten ist, dass Faktoren, die sich auf die Thrombozytenaggregation auswirken, verloren gehen. Während bei der Methode nach Born die Probe durch einen Rührstab in Bewegung gehalten wird, muss die Vollblutprobe während der Untersuchung geschwenkt werden. Die Messung des Vollblutes erfolgt mittels Durchflusszytometrie. Wenn die Thrombozyten im ADVIA 120™ und im VetABC™ durch eine Kapillare geleitet werden, kann es durch erhöhte Scherkräfte zu einer Erhöhung der Aggregation kommen (83), so dass möglicherweise erst Konzentrationen von 2 mg/ml Acetylsalicylsäure zu einer ausreichenden Hemmung der Aggregation führen.

Wenn man die unterschiedlichen Acetylsalicylsäurekonzentrationen zu einer unbehandelten Kontrolle bei dem Hämatologiegerät ADVIA 120™ vergleicht, zeigt sich ausschließlich eine signifikant niedrigere Aggregation zwischen der Konzentration 2 mg/ml und dem Ausgangswert. Allerdings ist auffällig, dass sich in der durchschnittlichen Aggregation ein Absinken der Mittelwerte im Vergleich zum Ausgangswert feststellen lassen, wenngleich dieser Trend sich als statistisch nicht signifikant erwies. So ist anzunehmen, dass erst eine Konzentration von 2 mg/ml zu einer ausreichenden Thrombozytenaggregationshemmung im Vollblut führt. Gleiches konnte auch für den VetABC™ festgestellt werden. Möglicherweise muss für die Vollblutaggregometrie auch eine höhere Dosierung angenommen werden, als bei der Aggregometrie nach Born. Wie schon bei der Kollagenkonzentration beschrieben, kann durch die Konzentration des Induktors möglicherweise eine höhere Konzentration an ASS nötig sein, um eine Aggregationshemmung zu erzielen.

In der Literatur wird in der Studie von Grauer *et al.* (1992) gezeigt, dass kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen mit Aspirin behandelten und unbehandelten Proben bezüglich der Thrombozytenaggregation im Vollblut festzustellen war (79). In dieser Studie wurde den Hunden eine Dosis von 3,5 mg/kg Aspirin eingegeben, allerdings wurde nicht erwähnt, welche ASS-Plasmaspiegel mit dieser Dosierung erreicht wurden. In der Humanmedizin wurde nachgewiesen, dass Patienten sehr individuell auf Aspirin reagieren können und auch sogenannte Aspirinresistenzen vorkommen, so dass trotz antikoagulativer Therapie Thrombosen

entstehen können (115) (83). Dieses individuelle Ansprechen auf Aspirin spiegelt sich auch in den hohen Standardabweichungen in dieser Studie wieder.

Bezüglich der einzelnen Konzentrationen untereinander und in Bezug auf die Inkubationszeit zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den einzelnen Messergebnissen. Ebenso wie beim Heparin vergleicht bisher keine Studie den Einfluss von unterschiedlichen Acetylsalicylsäurekonzentrationen und unterschiedlichen Inkubationszeiten bei Mensch oder Hund.

Schlussfolgerung

Insgesamt konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Vollblutaggregation mit Hämatologiegeräten – ähnlich wie zuvor für den Menschen gezeigt (95) – auch beim Hund möglich ist. Jedoch empfehlen wir aufgrund unserer Untersuchungen bei der Vollblutaggregation den Einsatz verschiedener Konzentrationen an Aggregationsinduktor (1 μ /ml und 10 μ g/ml Kollagen), um auch milde Thrombopathien detektieren zu können (16) und die Messabstände auf 10-12 Minuten auszudehnen, da wie bei der Messung von Patient 6 in der Aspiringruppe (Abbildung 33) gezeigt, innerhalb des gewählten Zeitraumes keine maximale Aggregation erreicht werden konnte. Da die Referenzwerte für die beiden getesteten Hämatologiegeräte variieren, empfiehlt es sich für jedes Gerät einen eigenen Referenzbereich mit gesunden Probanden zu bestimmen, bevor die eigentlichen Messungen erfolgen. Künftige Studien an Patienten sollen zeigen, ob mittels der hier etablierten Vollblutaggregation Thrombozytopathien detektiert werden können.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit sollte festgestellt werden, ob die Vollblutaggregometrie mittels eines Hämatologiesystems eine praxisrelevante Möglichkeit zur Feststellung der Thrombozytenfunktion (insbesondere Thrombozytopathien) beim Hund darstellt. Das Standardverfahren – die Aggregometrie nach BORN – erfordert eine schnelle Probenverarbeitung und ist aufgrund der hohen Gerätekosten für den Einsatz in der Praxis häufig nicht zugänglich. Als weiterer Nachteil dieser Methode ist das größere Probenvolumen zur Gewinnung von plättchenreichem Plasma (PRP) und die mögliche Aktivierung der Thrombozyten durch die Probenverarbeitung zu sehen. Im Gegensatz dazu stellt die Vollblutaggregometrie eine Möglichkeit dar, die Funktion der Thrombozyten bei Erkrankungen und zur Therapiekontrolle auch unter Praxisbedingungen zu überprüfen.

Die Untersuchungen erfolgten an Blutproben von 31 gesunden Hunden (15 männliche, 16 weibliche) mit einem medianen Alter von 4 Jahren (range 1-13 Jahre). Einschlusskriterium war eine unauffällige klinische, hämatologische und blutchemische Untersuchung. Am häufigsten vertreten war die Rasse Beagle mit 12 Hunden vertreten. Weiterhin gingen Daten von 8 Mischlingen, 3 Deutschen Schäferhunden sowie jeweils 2 Rauhaardackeln, Golden Retrievern und Border Collies in die Studie ein. Die Rassen Terrier und Weimaraner waren jeweils einmal vertreten.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Vollblutaggregometrie mittels der Hämatologiegeräte ADVIA120™ (Siemens) und VetABC (Scil) im Vergleich zum „Goldstandard“ der Aggregometrie nach Born überprüft werden. Der zweite Teil der Studie diente der Ermittlung des *in vitro* Einflusses unterschiedlicher Konzentrationen an Heparin (0,1; 1,0; 10,0 U/ml) und Acetylsalicylsäure (0,5; 1,0; 2,0 mg/ml) direkt nach Zugabe und nach 60 Minuten Einwirkzeit sowie des Vorhandenseins einer Anämie (Hämatokritwert von 0,15 – 0,19/l) auf die prozentuale Aggregation.

Die Blutentnahme erfolge am nüchternen Hund aus der *Vena jugularis* mittels einer 18 G Kanüle. Nach einer Ruhezeit der Proben von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde 20 ml Citratblut zur Herstellung von PRP 20 Minuten bei 190 g zentrifugiert. Die Aggregationsmessung nach Born erfolgte mit einem 4-Kanal Aggregometer

(APACT™, Labitec) mit 225 µl PRP und 25 µl Aggregationsinduktor (Kollagen) entsprechend einer Induktorkonzentration von 10 µg/ml. Der Endpunkt der Messung lag bei 8 Minuten.

Parallel dazu wurden drei Citratblutproben von jeweils 1 ml zur Vollblutaggregation vorbereitet. Die ersten zwei Proben dienten als Kontrolle: Die erste Probe (Citrat) blieb unbehandelt, in die zweite Probe (Kontrolle) wurden 100 µl NaCl und die dritte Probe (Probe) 100µl Aggregationsinduktor (Kollagen) entsprechend einer Induktorkonzentration von 10 mg/ml pipetiert. Die Messungen am ADVIA120™ und VetABC erfolgten jeweils zum Zeitpunkt 0 und 8 Minuten. Aus dem Absinken der Thrombozytenzahl nach der Aggregationsinduktion konnte dann die prozentuale Aggregation errechnet werden. Zusätzlich wurde der Einfluss der Thrombozytenaggregation auf die Thrombozytenparameter des ADVIA 120™ untersucht. Diese umfassten die mittlere Konzentration innerer Thrombozytenbestandteile (MPC) als Maß der Aktivierung, die Thrombozytenverteilungsbreite (PDW), der PCDW als Verteilungsbreite der mittleren Granularität, large PLT (große Thrombozyten), Thrombozytenaggregate (Clumps) und large unstained cells (große peroxidasenegative Zellen).

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software Graph pad prism 4.0, Graph pad Software Inc., San Diego, USA. Zur Anwendung kamen der Kolmogorow – Smirnov – Test zur Testung auf Normalverteilung, der Students T-test, eine einfaktorielle Varianzanalyse (One way – ANOVA) und zweifaktorielle Varianzanalyse (Two way – ANOVA) und bei statistischer Signifikanz ein Bonferroni's Multiple Comparison Test. Bei nicht normalverteilten Daten wurde der Dunn's Multiple Comparison Test als post – Test verwendet.

Die mittels APACT 4™ Aggregometer ermittelte Aggregation ergab einen Mittelwert von $77,46 \pm 16,23 \%$ (range 33,4 – 109,9 %), die am ADVIA 120™ gemessene Aggregation ergab einen Mittelwert von $89,88 \pm 3,01 \%$ (range 79,0 – 94,3 %) und die gemessene Aggregation des VetABC™ lag im Mittel bei $82,54 \pm 11,18 \%$ (range 39,1 – 93,7 %). Mittels linearer Regressionsanalyse konnte keine Korrelation zwischen den mit den verschiedenen Geräten ermittelten Aggregationswerten festgestellt werden. Die Induktion der Aggregation resultierte in einem signifikanten Anstieg des MPV von $9,419 \pm 1,855 \text{ fL}$ (range 6,0 – 13,4 fL) auf 12,82 (range 8,0 –

16,4) fL ($p < 0,001$). Der PCDW stieg von $6,797 \pm 1,644$ (range 3,9 – 9,0) g/dl auf $7,929 \pm 0,7542$ (range 5,3 – 8,9) g/dl ab. Der mediane PDW stieg signifikant von 63,70 % (range 53,50- 84,6 %) auf 84,40 % (range 22,30 – 98,9 %) an ($p < 0,001$). Ebenso wie die mediane Anzahl der LUCs von 0,02 (range 0,01 – 0,1) $\times 10^3$ Zellen/l auf 0,21 (range 0,02 – 0,47) $\times 10^3$ Zellen/l nachweisbar war ($p < 0,001$), was auf eine Messung von Thrombozytenaggregaten als „Leukozyten“ zurückzuführen ist.

Es kam zu einer signifikanten Abnahme des MPC von $23,12 \pm 2,577$ (range 18,0 – 27,5) g/dl auf 18,31 (range 12,2 – 27,5) g/dl ($p < 0,001$) übereinstimmend mit einer Aktivierung der Thrombozyten. Die large PLT fielen von $12,29 \pm 9,023$ (range 3,0 – 39,0) $\times 10^9$ Zellen/l auf $3,226 \pm 1,203$ (range 0 – 7,0) $\times 10^9$ Zellen/l ab. Die Clumps zeigten keine signifikante Veränderung durch Induktion der Aggregation (Kontrolle 33, Probe 37 Clumps) mit einem p-Wert von 0,2204. Das Vorhandensein einer Anämie zeigte keine statistisch signifikanten Veränderungen zur unbehandelten Probe (ADVIA 120: $p = 0,0849$ und VetABC: $p = 0,3154$). Eine Zugabe von Heparin resultierte bei der Methode nach Born in signifikant niedrigeren Aggregationswerten im Vergleich zu der Kontrolle bei einer Konzentration von 10 IE/ml ($p < 0,01$). Bei der Vollblutaggregometrie mittels ADVIA 120™ war das Ergebnis der Aggregation für Heparinkonzentrationen zwischen 0,1 IE und 10 IE/ml Blut statistisch signifikant niedriger ($68,6 \pm 25,5$ %) als der Ausgangswert ($80,6 \pm 20,1$ %; $p < 0,05$). Die Ergebnisse der mittels VetABC gemessenen Aggregation wurden dagegen nicht signifikant beeinflusst. Die Differenz der Messergebnisse zwischen ATRACT™ und ADVIA 120™ zeigte sich beim Vergleich der Konzentrationen 10 IE/ml und Kontrollwert signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$), bei der Differenz der Ergebnisse des ATRACT™ und des VetABC™ verhielt es sich ebenso ($p < 0,05$). Die Messunterschiede zwischen ADVIA 120™ und VetABC™ waren nicht statistisch signifikant verschieden. Die Einwirkzeit des Heparins von 0 bzw. 60 Minuten hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Aggregation.

Die mit der Methode nach Born ermittelte Aggregation war nach der Zugabe von 0,5 mg/ml, 1 mg/ml und 2 mg/ml Aspirin signifikant niedriger als die Ausgangskonzentration ($p < 0,001$). Am ADVIA 120™ und am VetABC™ zeigte sich ausschließlich im Vergleich der Konzentration von 2 mg/ml zum Kontrollwert statistisch signifikant niedrigere Aggregationswerte ($p < 0,01$). Ebenso wie bei Heparin hatte die Einwirkzeit des Aspirins von 0 bzw. 60 Minuten bei keinem der Geräte einen statistisch signifikanten Einfluss.

Anhand der Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass die errechnete Vollblutaggregation nach Thrombozytenzählung mittels konventioneller Hämatologiesysteme eine gute Alternative zu der Aggregometrie nach Born ist und somit eine – bisher nicht beschriebene - Messung der Thrombozytenfunktion auch in der Praxis durchführbar macht. Da die Referenzwerte je nach eingesetztem Hämatologiesystem variieren, empfiehlt es sich, bei der Anwendung der Vollblutaggregation in der Praxis für jedes Gerät einen eigenen Referenzbereich zu ermitteln.

Die Bestimmung der prozentualen Aggregation sollte mit einer Kollagenkonzentration von 1 µg/ml und 10 µg/ml stattfinden, um milde Thrombozytopathien nicht zu übersehen.

Aufgrund der hier gewonnenen Erkenntnisse sind weitere Studien zur Thrombozytenfunktionsmessung bei Erkrankungen mit gesteigerter und verminderter Funktion und zur Therapiekontrolle bei Patienten unter gerinnungshemmenden Medikamenten von großem Interesse, um den möglichen Nutzen für die Praxis vollständig zu bestätigen.

7. SUMMARY

The goal of this study was to evaluate whether whole blood aggregometry performed by routine haematology analysers is a valuable tool to assess canine thrombocyte function (especially thrombocytopathia) in routine veterinary practice. The reference method (BORN aggregometry) necessitates fast sample processing and is relatively impractical due to high costs. An additional disadvantage of this method is the large sample volume needed to create platelet-rich plasma (PRP) and the possibility of premature activation of platelets due to sample handling. In contrary, whole blood aggregometry seems to be a method that facilitates assessment of platelet function in a clinical setting.

Examination was performed using jugular blood samples from 31 fasted healthy dogs (15 male, 16 female) with a median age of 4 years (range 1-13 years). Inclusion criteria were obtained by results of a normal physical examination, haematology and blood chemistry analysis. The breeds represented included Beagle (n = 12), mixed breed dogs (n = 8), German Shepherd dog (n = 3), and two each of Wirehair Dachshund, Golden Retriever and Border Collies. One Weimaraner and one Terrier were also included.

In the first part of the study, whole blood aggregometry performed with the haematology analyser ADVIA120™ (Siemens) und VetABC (Scil) was compared with the Born aggregometry method. In a second part of the study, the effect of *in vitro* inhibition of aggregation with heparin (0.2; 1.0; 10.0 IU/mL) and acetylsalicylic acid (ASS; 0.5; 1.0; 2.0 mg/mL) was assessed as well as the effect of “anaemia” induced by *in vitro* haemodilution (haematocrit 0.15-0.20 L/L).

After collection, blood was stored in citrated tubes for 30 minutes; then, PRP was prepared. The Born aggregometry method was performed with the APACKT 4™ aggregometer (Labitec) with 225 µl PRP. 10 µg/mL collagen was used as an inductor. After 8 minutes, the percentage of aggregation was obtained from the aggregation curve. For assessment of aggregation with both haematology analysers, a platelet count was performed prior to and 8 minutes after *in vitro* induction of aggregation with 10 µg/mL collagen; and the percentage of aggregation was calculated. Citrated whole blood samples with and without 100 µl NaCl 0.9% served as negative controls. In addition, the effect of aggregation on platelet parameters measured with the ADVIA120™ was investigated. This included evaluation of changes in the mean platelet component concentration (MPC), which reflects platelet

activation, PCDW, which is the distribution width of the mean platelet components, the platelet distribution width (PDW), large platelets (large PLT), clumps (platelet aggregates) and the number of large unstained cells (LUC).

Statistical analysis was performed using the Software Graph pad prism 4.0 (Graph pad Software inc., San Diego, USA). The Kolmogorow – Smirnov – Test was used to test for normal distribution. The students – t – test, one way – ANOVA and a two – way – ANOVA were performed as well if deemed applicable. If data showed significant differences between the methods and normal distribution was proven, a Bonferroni's multiple comparison Test was subsequently performed. If normal distribution was not evident, a Dunn's multiple comparison Test was applied instead.

Aggregation measured with the Born method was $77,46 \pm 16.23$ % while values of 89.88 ± 3.0 % and $82,54 \pm 11.18$ % were obtained with the ADVIA120™ and VetABC™. There was no significant correlation between the methods. Induction of aggregation resulted in a significant increase of MPV from $9,419 \pm 1,855$ (range 6,0 – 13,4) fL to 12,82 (range 8,0 – 16,4) fL ($P < 0,001$). The PCDW increased from $6,797 \pm 1,644$ (range 3,9 – 9,0) g/dl to $7,929 \pm 0,7542$ (range 5,3 – 8,9)g/dl. The PCDW increased from 6,3,70% (range 53,5 – 84,6) to 84,40% (range 22,3 – 98,9) ($P < 0,01$). After platelet aggregation, the MPC decreased from 23.12 ± 2.57 (range 18,0 – 27,5) g/dL to 18.31 ± 2.37 (range 12,2 – 27,5) g/dL indicating platelet activation. The median number of LUCs increased significantly from 0.02 (0.01–0.1) $\times 10^3$ to 0.21 (0.02–0.47) $\times 10^3$ cells/L ($p < 0.001$), probably due to aggregates of platelets with leukocytes being falsely detected as leukocytes. The large PLT decreased from $12,29 \pm 9,023$ (range 3,0 – 39,0) $\times 10^9$ cells/L to $3,226 \pm 1,203$ (range 0 – 7,0) $\times 10^9$ cells/L. Platelet clumps showed no significant change ($P = 0,2204$).

Addition of heparin resulted in a lower aggregation at a dosage of 1.0 and 10.0 IU/L, however, this effect was only significant for the Born method and a heparin concentration of 10.0 U/mL ($p < 0.01$). Addition of ASS resulted in a significantly decreased aggregation determined with the Born method for all dosages, while this effect was only significant for ASS dosages of 2 mg/mL with the ADVIA120™ ($p < 0.001$) and VetABC ($p < 0.01$) measurements. Anaemia an incubation period was not associated with a significant change of whole blood platelet aggregation.

Our results show that whole blood platelet function testing can be easily performed in veterinary practice; however, reference ranges for each haematology analyser have to be established. Platelet aggregation should be performed with inductor concentrations of 1µg/ml and 10µg/ml to detect mild thrombocytopathias. However, further studies evaluating the methods used in this study are necessary to fully assess their usefulness, especially in patients with platelet dysfunction and patients with drug-induced thrombocytopathia.

8. LITERATURÜBERSICHT

- (1) Kaushansky K. The molecular mechanism that control thrombopoiesis. *J.Clin.Invest* 115[12], 3339-3347. 2005.
- (2) Kosugi S. Circulating thrombopoietin level in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Brit.J.Haemat.* 93, 704-706. 1996.
- (3) Kuter DJ, Rosenberg RD. The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan - induced thrombocytopenia in a rabbit. *Blood* 85, 2720-2730. 1995.
- (4) Sungaran R, Markovic B, Chong BH. The role of platelet alpha-granular proteins in the regulation of thrombopoietin messenger RNA expression in human bone marrow stromal cells. *Blood* 95, 3094-3101. 2000.
- (5) Yamashita K. Hepatocyte growth factor / scatter factor enhances the thrombopoietin mRNA expression in rat hepatocytes and cirrhotic rat livers. *Gastroenterol.Hepatol.* 15, 83-90. 2009.
- (6) Kaser A. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin; role in inflammatory thrombocytosis. *Blood* 98, 2720-2725. 2001.
- (7) Thrall MA, Baker DC, Campbell TW, DeNicola D, Fettman MJ, Lassen ED et al. *Veterinary Hematology And Clinical Chemistry*. 1 ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2004.
- (8) Tablin F. Platelet Structure and Function. In: Feldman, Zinkl, Jain, editors. *Schalm's Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000: 448-452.
- (9) White JG. Anatomy and structural organization of the platelet. In: Coleman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, editors. *Hemostasis and thrombosis, basic principles and clinical practice*. Philadelphia: JB Lippincott, 1994: 397-507.
- (10) Jennings LK, White MM, Mandrell TD. Interspecies comparison of platelet aggregation, LIBS expression and clot retraction: observed differences in GPIIb-IIIa functional activity. *Thromb Haemost* 1995; 74(6):1551-1556.
- (11) Ginsberg MH, Du X, O'Toole TE, Loftus JC. Platelet integrins. *Thromb.Haemost.* 74[1], 352-359. 1995.
- (12) Gentry PA. The mammalian blood platelet: its role in haemostasis, inflammation and tissue repair. *J.Comp.Pathol.* 1992; 107(3):243-270.
- (13) Hartwig JH. Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation. *J.Cell.Biol.* 118[6], 1421-1442. 1992.

- (14) Corash L, Costa JL, Shafer B, Donlon JA, Murphy D. Heterogeneity of human whole blood platelet subpopulations. III. Density-dependent differences in subcellular constituents. *Blood* 1984; 64(1):185-193.
- (15) Meyers KM, Holmsen H, Seachord CL. Comparative study of platelet dense granule constituents. *Am.J.Physiol.* 1982; 243(3):R454-R461.
- (16) Reuter HD. *Der Thrombozyt*. 2. ed. Köln: Science Data Supply, 1998.
- (17) Ruggeri ZM. New insights into the mechanisms of platelet adhesion and aggregation. *Semin.Hematol.* 31[3], 229-239. 1994.
- (18) Lopez JA, Dong JF. Structure and function of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Curr.Opin.Hematol.* 1997; 4(5):323-329.
- (19) Shattil SJ, Ginsberg MH, Brugge JS. Adhesive signaling in platelets. *Curr Opin Cell.Biol.* 1994; 6(5):695-704.
- (20) Murakami M, Kudo I. Cellular arachidonate-releasing functions of various phospholipase A2. *Adv.Exp.Med.Biol.* 525, 87-92. 2003.
- (21) Riondino S, Trifiro E, Principessa L, Mascioletti S, Di Renzo L, Gaudio C et al. Lack of biological relevance of platelet cyclooxygenase-2 dependent thromboxane A2 production. *Thromb.Res.* 122[3], 359-365. 2008.
- (22) Kumar, Abbas, Fausto. Acute and chronic inflammation. In: Robbins, Cotran, editors. *Pathologic Basis of Diseases*. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005: 47-87.
- (23) Gentry PA, Nyarko KA. Platelet Lipids and Prostaglandins. In: Feldman, Zinkl, Jain, editors. *Schalm's Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000: 453-458.
- (24) Löffler G, Petrides PE. *Biochemie und Pathobiochemie*. 5. Auflage ed. Berlin: Springer Verlag, 1997.
- (25) Bauer N, Moritz A. Koagulopathien bei Hund und Katze. *Tierärztliche Praxis* 36, 927-929. 2008.
- (26) Murray EW, Lillicrap D. Von Willebrand disease: pathogenesis, classification and management. *Transfus.Med.Rev.* 10[2], 93-110. 1996.
- (27) Moser J, Meyers KM, Russon RH. Inheritance of von Willebrand factor deficiency in Doberman pinschers. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 1996; 209(6):1103-1106.
- (28) Brooks M, Catalfamo J. Buccal mucosa bleeding time is prolonged in canine models of primary hemostatic disorders. *Thromb.Haemost.* 1993; 70(5):777-780.

- (29) Pedersen HD, Haggstrom J, Olsen LH, Christensen K, Selin A, Burmeister ML et al. Idiopathic asymptomatic thrombocytopenia in Cavalier King Charles Spaniels is an autosomal recessive trait. *J.Vet.Intern.Med.* 2002; 16(2):169-173.
- (30) Buchanan JW, Beardow AW, Sammarco CD. Femoral artery occlusion in Cavalier King Charles Spaniels. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 211, 872-874. 1997.
- (31) Glanzmann E. Herediäre hämorrhagische Thrombastenie. Ein Beitrag zur Pathologie der Blutplättchen. *J.Kinderkrankheiten* 88, 113-141. 1918.
- (32) Lipscomb DL, Bourne C, Boudreaux MK. Two genetic defects in alphaIIb are associated with type I Glanzmann's thrombasthenia in a Great Pyrenees dog: a 14-base insertion in exon 13 and a splicing defect of intron 13. *Vet.Pathol.* 2000; 37(6):581-588.
- (33) Boudreaux MK, Kvam K, Dillon AR, Bourne C, Scott M, Schwartz KA et al. Type I Glanzmann's thrombasthenia in a Great Pyrenees dog. *Vet.Pathol.* 1996; 33(5):503-511.
- (34) Boudreaux MK, Kvam K, Dillon AR, Bourne C, Scott M, Schwartz KA et al. Type I Glanzmann's thrombasthenia in a Great Pyrenees dog. *Vet.Pathol.* 1996; 33(5):503-511.
- (35) Johnstone IB, Lotz F. An inherited platelet function defect in Basset hounds. *Can.Vet.J.* 1979; 20(8):211-215.
- (36) Mattson JC, Estry DW, Bell TG, Patterson WR. Defective contact activation of platelets from dogs with basset hound hereditary thrombopathy. *Thromb.Res.* 1986; 44(1):23-38.
- (37) Patterson WR, Padgett GA, Bell TG. Abnormal release of storage pool adenine nucleotides from platelets of dogs affected with basset hound hereditary thrombopathy. *Thromb.Res.* 1985; 37(1):61-71.
- (38) Boudreaux MK, Dodds WJ, Slauson DO, Catalfamo JL. Impaired cAMP metabolism associated with abnormal function of thrombopathic canine platelets. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1986; 140(2):595-601.
- (39) Boudreaux MK, Lipscomb DL. Clinical, Biochemical and Molecular Aspects of Glanzmann's Thrombasthenia in Humans and Dogs. *Vet.Pathol.* 38, 249-260. 2001.
- (40) Weiss HJ. Inherited Abnormalities of Platelet Granules and Signal Transduction. In: Coleman, Hirsh, Marder, Salzman, editors. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. Philadelphia: Lippincott Company, 1994.

- (41) Davis GL. Quantitative and Qualitative Disorders of Platelets. In: Stiene - Martin, Lotspeich-Steininger, Koepke, editors. Clinical Hematology. Philadelphia: Lippincott, 1998: 717-733.
- (42) Callan MB, Bennett JS, Phillips DK, Haskins ME, Hayden JE, Anderson JG et al. Inherited platelet delta-storage pool disease in dogs causing severe bleeding: an animal model for a specific ADP deficiency. *Thromb.Haemost.* 1995; 74(3):949-953.
- (43) Boudreaux MK. Acquired Platelet Dysfunction. In: Feldman, Zinkl, Jain, editors. Schalm's Veterinary Hematology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000: 496-500.
- (44) Brassard JA, Meyers KM, Person M, Dhein CR. Experimentally induced renal failure in the dog as an animal model of uremic bleeding. *J.Lab.Clin.Med.* 1994; 124(1):48-54.
- (45) Mischke R, Schulze U. Studies on platelet aggregation using the Born method in normal and uraemic dogs. *Vet.J.* 2004; 168(3):270-275.
- (46) Walkowiak B, Michalak E, Borkowska E, Koziolkiewicz W, Cierniewski CS. Concentration of RGDS-containing degradation products in uremic plasma is correlated with progression in renal failure. *Thromb.Res.* 1994; 76(2):133-144.
- (47) Noris M, Benigni A, Boccardo P. Enhanced nitric oxide synthesis in uremia: implications for platelet dysfunction and dialysis hypotension. *Kindney Int.* 44, 445-450. 1993.
- (48) Laffi G, Cominelli F, Ruggiero M, Fedi S, Chiarugi VP, La Villa G et al. Altered platelet function in cirrhosis of the liver: impairment of inositol lipid and arachidonic acid metabolism in response to agonists. *Hepatology* 1988; 8(6):1620-1626.
- (49) Willis SE, Jackson ML, Meric SM, Rousseaux CG. Whole blood platelet aggregation in dogs with liver disease. *Am.J.Vet.Res.* 1989; 50(11):1893-1897.
- (50) Kuehn NF, Gaunt SD. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 1985; 186(4):355-358.
- (51) Varela F, Font X, Valladares JE, Alberola J. Thrombocytopathia and light-chain proteinuria in a dog naturally infected with *Ehrlichia canis*. *J.Vet.Intern.Med.* 1997; 11(5):309-311.
- (52) Baker RI, Manoharan A. Platelet function in myeloproliferative disorders: characterization and sequential studies show multiple platelet abnormalities, and change with time. *Eur.J.Haematol.* 1988; 40(3):267-272.

- (53) Schafer AI. Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on platelet function and systemic hemostasis. *J.Clin.Pharmacol.* 1995; 35(3):209-219.
- (54) Richter K. Perioperative Applikation nichtsteroidaler Antiphlogistika und der Einfluss auf die Blutungsneigung beim Hund. *Klinikum Veterinärmedizin Justus Liebig Universität Giessen*, 2008.
- (55) Burroughs SF, Johnson GJ. Beta-lactam antibiotics inhibit agonist-stimulated platelet calcium influx. *Thromb.Haemost.* 1993; 69(5):503-508.
- (56) Schermerhorn T, Barr SC, Stoffregen DA, Koren-Roth Y, Erb HN. Whole-blood platelet aggregation, buccal mucosa bleeding time, and serum cephalothin concentration in dogs receiving a presurgical antibiotic protocol. *Am.J.Vet.Res.* 1994; 55(11):1602-1607.
- (57) Rostagno C, Abbate R, Gensini GF, Coppo M, Prisco D, Boddi M et al. In vitro effects of two novel calcium antagonists (nitrendipine and nisoldipine) on intraplatelet calcium redistribution, platelet aggregation and thromboxane A2 formation. Comparison with diltiazem, nifedipine and verapamil. *Thromb.Res.* 1991; 63(4):457-462.
- (58) Tschoepe D, Roesen P, Esser J, Schwippert B, Nieuwenhuis HK, Kehrel B et al. Large platelets circulate in an activated state in diabetes mellitus. *Semin.Thromb.Hemost.* 1991; 17(4):433-438.
- (59) Goubran F, Maklady F. In vivo platelet activity and serum albumin concentration in nephrotic syndrome. *Blut* 1988; 57(1):15-17.
- (60) Machleidt C, Mettang T, Starz E, Weber J, Risler T, Kuhlmann U. Multifactorial genesis of enhanced platelet aggregability in patients with nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 1989; 36(6):1119-1124.
- (61) Sirolli V, Ballone E, Garofalo D, Merciaro G, Settefrati N, Di Mascio R et al. Platelet activation markers in patients with nephrotic syndrome. A comparative study of different platelet function tests. *Nephron* 2002; 91(3):424-430.
- (62) Green RA, Russo EA, Greene RT, Kabel AL. Hypoalbuminemia-related platelet hypersensitivity in two dogs with nephrotic syndrome. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 1985; 186(5):485-488.
- (63) Wolf RF, Peng J, Friese P, Gilmore LS, Burstein SA, Dale GL. Erythropoietin administration increases production and reactivity of platelets in dogs. *Thromb.Haemost.* 1997; 78(6):1505-1509.
- (64) McNiel EA, Ogilvie GK, Fettman MJ, Salman MD. Platelet hyperfunction in dogs with malignancies. *J.Vet.Intern.Med.* 1997; 11(3):178-182.

- (65) Mantur M, Kemona H, Pietruczuk M, Wasiluk A. Does renal carcinoma affect the expression of P-selectin on platelets? *Neoplasma* 2002; 49(4):243-245.
- (66) Boudreaux MK, Dillon AR, Spano JS. Enhanced platelet reactivity in heartworm-infected dogs. *Am.J.Vet.Res.* 1989; 50(9):1544-1547.
- (67) Moritani C, Ishioka S, Haruta Y, Kambe M, Yamakido M. Activation of platelets in bronchial asthma. *Chest* 1998; 113(2):452-458.
- (68) Keidel A, Mischke R. [Clinical evaluation of platelet function analyzer PFA-100 in dogs]. *Berl.Münch.Tierarztl.Wochenschr.* 1998; 111(11-12):452-456.
- (69) Plump DC. *Veterinary Drug Handbook*. third ed. White Bear Lake, Minnesota: Pharma.Vet. Publishing, 1999.
- (70) Fareed J, Jeske W, Eschenfelder V. Preclinical studies on a low molecular weight heparin. *Thromb.Res.* 81, 1-27. 1996.
- (71) Day JR, Landis RC, Taylor KM. Heparin is much more than just an anticoagulant. *J.Cardi thorac.Vasc.Anesth.* 2004; 18(1):93-100.
- (72) Xiao Z, Theroux P. Platelet activation with unfractionated heparin at therapeutic concentrations and comparisons with a low-molecular-weight heparin and with a direct thrombin inhibitor. *Circulation* 1998; 97(3):251-256.
- (73) Rohrer MJ, Kestin AS, Ellis PA, Barnard MR, Rodino L, Breckwoldt WL et al. High-dose heparin suppresses platelet alpha granule secretion. *J.Vasc.Surg.* 1992; 15(6):1000-1008.
- (74) Eika C. Inhibition of thrombin induced aggregation of human platelets by heparin. *Scand.J.Haematol.* 1971; 8(3):216-222.
- (75) Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet GPIb-V-IX complex. Structure, function, physiology, and pathology. *Semin.Thromb.Hemost.* 1995; 21(2):130-136.
- (76) Mischke R, Nimmerfall K. Influence of a high single subcutan dose of unfractionated heparin on platelet function in dogs. *Berl.Münch.Tierarztl.Wochenschr.* 2000; 113(2):60-64.
- (77) Leuser C. *Das Schwein als Modelltier zur endovaskulären Embolisation von zerebralen arteriovenösen Malformationen beim Menschen*. Klinikum Veterinärmedizin Justus Liebig Universität Giessen, 2009.
- (78) Boudreaux MK, Dillon AR, Ravis WR, Sartin EA, Spano JS. Effects of treatment with aspirin or aspirin/dipyridamole combination in heartworm-negative, heartworm-infected, and embolized heartworm-infected dogs. *Am.J.Vet.Res.* 1991; 52(12):1992-1999.

- (79) Grauer GF, Rose BJ, Toolan L, Thrall MA, Colgan SP. Effects of low-dose aspirin and specific thromboxane synthetase inhibition on whole blood platelet aggregation and adenosine triphosphate secretion in healthy dogs. *Am.J.Vet.Res.* 1992; 53(9):1631-1635.
- (80) Campbell CL, Steinhubl SR. Variability in response to aspirin: do we understand the clinical relevance? *Thromb.Haemost.* 3, 655-659. 2005.
- (81) Zimmermann N, Wenk A, Kim U, Kienzle P, Weber AA, Gams E et al. Functional and biochemical evaluation of platelet aspirin resistance after coronary artery bypass surgery. *Circulation* 108, 542-547. 2003.
- (82) Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, Johnston M, Yi Q, Yusuf S. Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation* 105, 1650-1655. 2002.
- (83) Folts JD, Schafer AI, Loscalzo J, Willerson JT, Muller JE. A perspective on the potential problems with aspirin as an antithrombotic agent: a comparison of studies in an animal model with clinical trials. *J.Am.Coll.Cardiol.* 1999; 33(2):295-303.
- (84) Jergens AE, Turrentine MA, Kraus KH, Johnson GS. Buccal mucosa bleeding times of healthy dogs and of dogs in various pathologic states, including thrombocytopenia, uremia, and von Willebrand's disease. *Am.J.Vet.Res.* 1987; 48(9):1337-1342.
- (85) Nolte I, Niemann C, Bowry SK, Failing K, Muller-Berghaus G. A method for measuring capillary bleeding time in non-anaesthetized dogs: prolongation of the bleeding time by acetylsalicylic acid. *Zentralbl.Veterinarmed.A* 1997; 44(9-10):625-628.
- (86) Breddin HK. In - vitro- Methoden zur Beurteilung der Plättchenfunktion. In: Medizinische Universitätsklinik Frankfurt a.M.(Prof.Dr.F.Hoff), editor. Blut Band XVIII. Frankfurt: 1968: 84-89.
- (87) Kraft W, Dürr UM. Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. 3 ed. Stuttgart: F. K. Schattauer, 1995.
- (88) Hartert H. Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren. *Klinische Wochenschrift* 16[37], 257. 1948.
- (89) Mischke R. Hämostase. In: Kraft W, Dürr UM, editors. Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. Stuttgart: F. K. Schattauer, 2005: 115-142.
- (90) Born G. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversals. *Nature*, 927-929. 1962.

- (91) Breddin HK. Can platelet aggregometry be standardized? *Platelets* 2005; 16(3-4):151-158.
- (92) Cardinal DC, Flower RJ. The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J.Pharmacol.Methods* 1980; 3(2):135-158.
- (93) Ozaki Y. Measurement of Platelet Aggregation and Attempts for Standardization. *Sysmex J.Int.* 8, 15-22. 1998.
- (94) Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, Garcia C, Davidson RM, Ostgaard RA. Description of an in vitro platelet function analyzer--PFA-100. *Semin.Thromb. Hemost.* 1995; 21 Suppl 2:106-112.
- (95) Pinkowski R, Kostka B, Wlazlowski R, Sikora J, Goch A, Paradowski M et al. Use of a Hematology Analyzer to Estimate Platelet Aggregation in Patients With Myocardial Infarction. *Laboratory Hematology* 7, 186-190. 2001.
- (96) Dotson MA. Multiparameter Hematology Instruments. In: Stiene-Martin, Lotspeich-Steininger, Koepke, editors. *Clinical Hematology*. Philadelphia: Lippincott, 1998: 519-551.
- (97) Coulter WH. High speed automatic blood cell counter and size analyzer. *Proceedings of the National Electronics Conference* 1956; 12:1034-1042.
- (98) Moritz A. Der Einsatz lasergestützter Multiparameter - Hämatologiesysteme in der Veterinärmedizin. Gießen: Büchse der Pandora Verlags-GmbH, 2000.
- (99) Moritz A, Fickenscher Y, Meyer K, Failing K, Weiss DJ. Canine and feline hematology reference values for the ADVIA 120 hematology system. *Vet.Clin.Pathol.* 2004; 33(1):32-38.
- (100) Ahnadi CE, Boughrassa FF, Chapman-Montgomery ES, Poisson V, Gervais A, Okrongly D et al. Comparison of two methods to assess variability of platelet response to anti-platelet therapies in patients with acute coronary syndrome undergoing angioplasty. *Thromb.Haemost.* 2004; 92(6):1207-1213.
- (101) Chapman ES, Sorette M, Hetherington E, Zelmanovic D, Kling G, Dugailliez J et al. A rapid, automated flow cytometric method to measure activated degranulated platelets by density determination. *Thromb.Haemost.* 2003; 89(6):1004-1015.
- (102) Moritz A, Walkowiak B, Weiss DJ. Evaluation of flow cytometric and automated methods for detection of activated platelets in dogs with inflammatory diseases. *Am.J.Vet.Res.* 66[2], 325-329. 2005.
- (103) Boos CJ, Beevers GD, Lip GY. Assessment of platelet activation indices using the ADVIATM 120 amongst "high-risk" patients with hypertension. *Ann.Med.* 39[1], 72-78. 2007.

- (104) Meyers. Platelet responses and metabolism. Boca Raton: CRC Press, 1986.
- (105) Mischke R, Schulze U. Studies on platelet aggregation using the Born method in normal and uraemic dogs. *Vet.J.* 2004; 168(3):270-275.
- (106) Soloviev MV, Okazaki Y, Harasaki H. Whole blood platelet aggregation in humans and animals: a comparative study. *J.Surg.Res.* 1999; 82(2):180-187.
- (107) Silver WP, Keller MP, Teel R, Silver D. Effects of donor characteristics and platelet in vitro time and temperature on platelet aggregometry. *J.Vasc.Surg.* 1993; 17(4):726-733.
- (108) Budde U. Diagnose von Funktionsstörungen der Thrombozyten mit Hilfe der Aggregometrie. *J.Lab.Med.* 26[11/12], 564-571. 2002.
- (109) Petrie A, Watson P. *Statistics for Veterinary and Animal Science*. 2 ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2006.
- (110) Petrie A, Watson P. *Statistics for Veterinary and Animal Science*. 2 ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2006.
- (111) Macey MG, Carty E, Webb L, Chapman ES, Zelmanovic D, Okrongly D et al. Use of mean platelet component to measure platelet activation on the ADVIA 120 haematology system. *Cytometry* 1999; 38(5):250-255.
- (112) Michelson AD. *Platelets*. 2 ed. Burlington: Elsevier Inc., 2007.
- (113) Kaito K, Otsubo H, Usui N, Yoshida M, Tanno J, Kurihara E. Platelet size deviation width, platelet large cell ratio and mean platelet volume have sufficient sensitivity and specificity in the diagnosis of immune thrombocytopenia. *Brit.J.Hemat.* 128, 698-702. 2005.
- (114) Mischke R, Keidel A. Influence of platelet count, acetylsalicylic acid, von Willebrand's disease, coagulopathies, and haematocrit on results obtained using a platelet function analyser in dogs. *Vet.J.* 165[1], 43-52. 2003.
- (115) Svenstrup Poulsen T, Risom Kristensen S, Atar D, Mickley H. A critical appraisal of the phenomenon of aspirin resistance. *Cardiology* 2005; 104(2):83-91.

9. DANKSAGUNG

Zum Abschluss möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. Andreas Moritz für die Überlassung des interessanten Themas und Frau Dr. Natali Bauer für die hervorragende Betreuung während der Erstellung der Dissertation.

Ich danke Herrn Dr. Matthias Schneider für die fachlichen Ratschläge und unermütlchen Erklärungen bei der statistischen Auswertung und Interpretation.

Weiterhin danke ich dem Institut für Biomathematik insbesondere Herrn Failing, der an der statistischen Auswertung der Daten beteiligt war.

Die Untersuchung der Hämatologie und klinischen Chemie fand in der Regel durch die medizinisch – technischen Assistentinnen und Assistenten statt, denen ich hier meinen Dank aussprechen möchte, vor allem wegen ihrer Geduld wenn der ADVIA für die Routineuntersuchungen aufgrund meiner Messungen gerade nicht zugänglich war. Besonders Frau Jüngst – Carter war eine große Hilfe bei der Durchführung der gerinnungstechnischen Untersuchungen und unterstützte diese Studie durch ihre ruhige und motivierende Art.

Ich möchte mich bei den Besitzern der Hunde für die Bereitstellung der Proben bedanken und bei allen Helfern und Haltern während der Untersuchung.

Ein besonderer Dank gilt meinen Kolleginnen und Kollegen der Kleintierklinik, die mich sowohl mit Probanden versorgten, als auch immer wieder motivierende oder tröstende Worte fanden. Vielen Dank auch den Diensthabenden, die mich während der nächtlichen Messungen mit Kaffee und Essen versorgt haben.

Bei meiner Schwägerin Sabine möchte ich mich für die Unterstützung bei der graphischen Umsetzung der Bilder bedanken. Das eigene Verständnis von Microsoft Freehand hätte sicherlich nicht zu diesen Graphiken geführt.

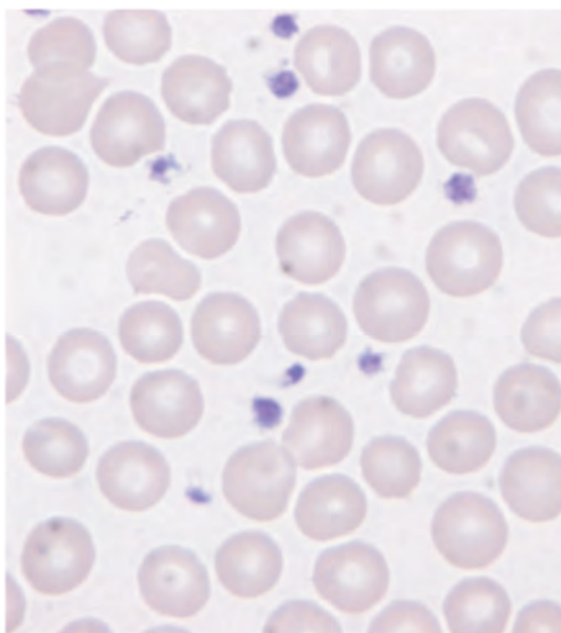
Vielen Dank meinen Freunden und Bekannten (vor allem Jens, Inka, Sandra, Estelle, Manfred, Irina und Babs), die vermutlich am meisten unter meiner Laune nach „dissertationstechnischen“ Rückschlägen zu leiden hatten und trotzdem immer wieder aufmunternde Worte fanden.

Ein herzliches Dankeschön an meine Oma, die mich finanziell unterstützte und ohne deren fortwährende Fragen nach dem Voranschreiten meiner Doktorarbeit die Dissertation sicherlich noch länger gedauert hätte, als sie es sowieso schon hat.

Nicht zuletzt ist die Dissertation meiner Mutter gewidmet, ohne die vermutlich weder mein Studium, meine Ausbildungszeit in der Klinik noch meine Doktorarbeit möglich gewesen wäre. Vielen Dank für die finanzielle Unterstützung und vor allem Möglichkeit jederzeit nach Hause zu kommen, um sich trösten, aufmuntern und verwöhnen zu lassen.

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



édition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5561-6



9 783835 195561